

Étude de l'influence des polluants environnementaux sur l'incidence du diabète de type 2

Claessens Julien

Pharmacien

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques
Année académique 2024-2025

« Courage, c'est la dernière ligne droite » est une phrase que j'ai entendue de nombreuses fois au cours de ces derniers mois. Si de prime abord la comparaison entre la réalisation d'une thèse de doctorat et un grand objectif sportif comme un marathon semble surréaliste, en y regardant de plus près, il existe pourtant de nombreuses similitudes entre les deux. Que ce soit pour la préparation d'un marathon ou la réalisation de travaux de recherche, nous avons besoin de différentes personnes à nos côtés pour nous guider afin de nous préparer de la meilleure façon ou simplement pour nous encourager quand le chemin se complique et que les crampes arrivent. Par ces quelques lignes, je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé à, finalement, franchir la ligne d'arrivée.

Tout d'abord, je tiens à remercier Camille, à mes côtés depuis plus de 10 ans, qui me soutient dans tous les projets que j'entreprends et avec qui je partage les plus beaux succès, mais aussi les moments difficiles. La vie serait moins belle si je ne la passais pas à tes côtés.

Je tiens à remercier ma promotrice, la Professeure Corinne Charlier, qui m'a accueilli au sein du Service de Toxicologie où j'ai disposé d'un environnement adéquat à la réalisation de mes travaux. Vous m'avez également encouragé à persévéérer dans les moments difficiles de la réalisation de cette thèse. Votre excellence professionnelle marquera non seulement mon passage à l'Université de Liège, mais également le futur de ma carrière. Je remercie également Monsieur Plomteux pour ses conseils judicieux lors de nos réunions du jeudi.

J'adresse mes remerciements à Catherine Pirard dont les conseils avisés et l'aide inestimable m'ont été plus que précieux durant ces années. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Patrice Dufour pour son soutien constant, sa patience, sa bienveillance et son expertise, sans lesquels je ne serais sans doute pas arrivé au bout de ce travail. La collaboration avec vous deux a été un pilier essentiel de la réalisation de cette thèse.

J'adresse ma plus sincère gratitude aux Professeurs Philippe Hubert, Nicolas Paquot et Etienne Cavalier pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et pour leurs conseils lors des réunions annuelles. Je suis également reconnaissant envers la Professeure Greet Schoeters et le Professeur Serge Rudaz qui ont accepté de lire et évaluer mes travaux.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Paquot, Marjorie Fadeur et tous les médecins du Service de Diabétologie du CHU de Liège pour leur collaboration dans le recrutement des patients diabétiques.

Bien sûr, aucune étude n'aurait pu être réalisée sans la participation des volontaires. Je tiens à remercier l'ensemble des volontaires qui ont mis à ma disposition un peu de leur temps et leurs échantillons sans lesquels aucun travail n'aurait pu être réalisé.

Un grand merci au service de Chimie Clinique du Professeur Cavalier pour l'aide apportée dans le dosage de l'hémoglobine glyquée et des lipides sériques.

Je tiens également à remercier Mesdames Eva Govarts et Bianca Cox pour leurs précieux conseils apportés pour la modélisation de certains modèles statistiques.

La réalisation de cette thèse fut un travail d'équipe et chaque membre du laboratoire de Toxicologie a, d'une façon ou d'une autre, contribué à son aboutissement. Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement Ayrton pour son aide directe sur le terrain ainsi que dans l'analyse de certains échantillons. Merci également à tous les technologues avec qui j'ai eu la chance de partager le laboratoire : Nico, Guillaume, Isabeau, Virginie, Delphine,

Remerciements

Charlotte, Cassandra, Sabrina, Amandine, Alexia, Cédric, Donovan. Merci à Nimet, stagiaire que j'ai eu l'opportunité d'encadrer et qui a collaboré à la réalisation de mes travaux. Merci aux secrétaires Shirley, Audrey et Nadette pour votre aide logistique et administrative durant ces années. Merci à Marine d'avoir partagé, un temps, mon bureau et pour tes idées de voyages pendant les pauses où nous avions besoin de nous évader mentalement. Merci à Nath de m'avoir régulièrement fait profiter de ton expertise. Merci à Raph pour ton soutien et ta bienveillance, parfois dans des moments difficiles. Les séminaires donnés avec toi étaient chaque fois de bons moments. Merci à Trésor pour ta compagnie et ta bonne humeur dans le bureau. Merci également à Patrice et Thomas pour leurs coups de main parfois réguliers chez « GLP ». Merci à Isabelle et Céline, mes collègues du Hainaut.

Merci à Noémie pour le coup de main linguistique.

Merci à mes parents pour leur soutien depuis près de 30 ans. Vous m'avez toujours donné l'opportunité de suivre ma voie et m'avez inculqué des valeurs dont je suis aujourd'hui fier.

Plus largement, merci à ma famille : Xavier et Sébastien et les Morgane, Anne, Thierry et Julia pour toute votre aide apportée durant ces années. J'ai également la chance d'être entouré dénormément de personnes qui ont toujours été là, dans les bons et moins bons moments : Martin et Gégé, John, Hadrien, Djenan, Fabien, Lauranne, François, Juliet, Gauthier, Florine, Pauline, Martin, Elise, Doris, Lucie, Michael, Isaline, Sébastien et Cindy, Loïc, Simon, John, Harry.

Depuis plusieurs dizaines d'années, l'incidence du diabète de type 2 est en forte augmentation et son apparition est de plus en plus précoce. Parallèlement, le nombre de substances chimiques présentes dans l'environnement, contaminant par conséquent les organismes vivants, dont l'Homme, a fortement augmenté. Or, de nombreuses substances chimiques ont montré lors d'études effectuées en laboratoire qu'elles pouvaient interagir avec le métabolisme du glucose et potentiellement favoriser le diabète de type 2. La preuve du lien entre les perturbateurs endocriniens et le diabète de type 2 chez l'Homme doit être apportée par des études épidémiologiques. Cependant, les résultats de la littérature demeurent pour l'instant incohérents.

L'objectif de notre travail est de contribuer à la compréhension du lien potentiel entre la pollution chimique et le diabète de type 2.

Dans un premier temps, nos recherches bibliographiques ont pointé que de nombreuses substances incriminées pour leur lien potentiel avec le diabète de type 2 sont des composés dont la demi-vie biologique est courte. Ces composés, qualifiés de polluants non persistants, sont habituellement mesurés dans l'urine mais la mesure de leurs concentrations dans les échantillons urinaires ne permet pas d'établir la contamination chronique pour ce type de composés. Pour pallier cette limitation, nous avons investigué l'utilisation du cheveu comme matrice pour le monitoring des polluants environnementaux.

Nous avons validé une méthode d'analyse de 13 polluants environnementaux (trois parabènes, deux bisphénols et huit composés perfluorés). Nous avons ensuite réalisé un biomonitoring de ces composés dans les cheveux de 114 individus vivant en Province de Liège. Ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence des trois parabènes, des deux bisphénols et du PFOA dans 46,4 % à 97,4 % des échantillons.

Afin de comprendre quelles informations sont effectivement fournies par les cheveux, nous avons ensuite comparé les niveaux de contamination de différents polluants chimiques dans le cheveu et le sérum pour huit PFAS et six PCB et dans l'urine et le cheveu pour trois parabènes et deux bisphénols. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que de nombreux paramètres autres que la concentration ou le temps de contact influencent l'absorption des composés chimiques dans le cheveu et que les informations fournies par le cheveu et les autres matrices sont différentes.

Nous avons investigué le lien entre le diabète de type 2 et la contamination en mettant en place une étude transversale au cours de laquelle nous avons comparé les niveaux de contamination pour 51 perturbateurs endocriniens (plusieurs substances per- et polyfluoroalkylées, plusieurs polychlorobiphényles, des bisphénols, des métabolites des phtalates, des pesticides organophosphorés et des pesticides organochlorés, la benzophénone 3 et le triclosan) chez 105 patients diabétiques et 98 volontaires sains. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence plusieurs associations positives entre différents polluants et le diabète de type 2.

En plus de l'approche monopolluants, nous avons investigué l'effet de la coexposition simultanée à plusieurs polluants de l'étude en utilisant deux méthodes statistiques : la *weighted quantile sum regression* et la *Bayesian Kernel machine regression*. Ces analyses ont permis de mettre en évidence que les mélanges de polluants étaient positivement associés au risque de diabète de type 2. Nous avons également montré que certains polluants étaient identifiés comme principalement associés à la pathologie.

Le nombre de substances anthropogènes présentes dans l'environnement ne cesse d'augmenter, et les effets de certaines d'entre elles sur le système endocrinien se pr  cisen. Plusieurs composés sont mis en évidence pour leurs impacts sur la santé et leurs effets sur l'homéostasie du glucose. Par nos travaux, nous avons souhaité contribuer à l'investigation de l'incidence des perturbateurs endocriniens sur le diabète de type 2 en intégrant la recherche de solutions pour le dosage des composés non persistants ainsi qu'une approche statistique mixte permettant de mettre en évidence les effets cocktails.

Abstract

Over the past few decades, the incidence of type 2 diabetes has drastically increased, and its appearance has been detected at earlier ages. In parallel, the number of chemical substances in the environment that contaminate living organisms and humans has significantly risen. Several *in vitro* and *in vivo* animal studies have shown that these substances can interfere with glucose metabolism and potentially favor type 2 diabetes. In humans, the link between exposure to endocrine disrupters and type 2 diabetes can be established by epidemiological studies. However, the existing results in the literature are inconsistent.

This work aims to deepen our understanding of the relationship between chemical pollution and type 2 diabetes.

First, our literature review showed that multiple chemicals that could potentially affect type 2 diabetes are compounds with a short biological half-life. These compounds, known as non-persistent organic pollutants, are usually measured in urine. However, their quantification in urine does not represent chronic exposure to this type of pollutant. To overcome this limitation, we investigated the use of hair as an alternative media for biomonitoring of environmental pollutants.

We validated an analytical method for the measurement of 13 environmental pollutants in hair (three parabens, two bisphenols, and eight per- and polyfluoroalkyl substances). We then measured the contamination levels of these compounds in the hair of 114 non-occupationally exposed individuals living in the Liège area. This work revealed the presence of the three parabens, two bisphenols, and perfluorooctanoic acid in 46,4 % to 97,4 % of the samples.

To understand the information provided by hair samples, we compared the contamination levels of different chemicals in hair and serum (for eight PFAS and six PCBs) and in hair and urine (for three parabens and two bisphenols). This study highlighted that several parameters, other than concentration and contact time, influence absorption in the hair matrix, and that the information provided by hair is different than the one provided by the other matrices.

We investigated the link between contamination and type 2 diabetes by conducting a cross-sectional study in which we compared the contamination levels of 51 endocrine disruptors (per- and polyfluoroalkyl substances, polychlorinated biphenyls, bisphenols, phthalate metabolites, parabens, organochlorine pesticides, organophosphate pesticides, benzophenone-3, triclosan) in 105 type 2 diabetic patients and 98 healthy volunteers. Our

Abstract

study showed several positive correlations between endocrine disruptor contamination and type 2 diabetes.

In addition to the mono-pollutant statistical analysis, we examined the effect of co-exposure to multiple substances using two statistical methods: weighted quantile sum regression and Bayesian kernel machine regression. These analyses showed that cocktails of pollutants are positively associated with the risk of type 2 diabetes. We also found that some pollutants were identified as being predominantly associated with the pathology.

The number of anthropogenic substances in the environment is still increasing and the effects of some of these substances on the endocrine system are well known. Multiple compounds have been shown to interfere with health and glucose homeostasis. With our work, we have contributed to the investigation of the impact of endocrine-disrupting chemicals on type 2 diabetes, integrating research of solutions to monitoring non-persistent pollutants and combined statistical approaches to investigate the cocktail effects.

Chapitre 1. INTRODUCTION	16
1.1 Les produits chimiques à effets perturbateurs endocriniens.....	17
1.2 Les grandes familles chimiques de perturbateurs endocriniens.....	21
1.2.1 Les composés organiques persistants	21
1.2.1.1 Le dichlorodiphényltrichloroéthane.....	22
1.2.1.2 Les polychlorobiphényles	23
1.2.1.3 Les substances per- et polyfluoroalkylées.....	24
1.2.2 Les polluants chimiques non persistants.....	26
1.2.2.1 Les bisphénols	26
1.2.2.2 Le triclosan	28
1.2.2.3 La benzophénone-3.....	29
1.2.2.4 Les phtalates.....	30
1.2.2.5 Les parabènes.....	32
1.2.2.6 Les pesticides organophosphorés	34
1.3 Le métabolisme glucidique.....	36
1.4 Association entre diabète et PE	37
1.4.1 Les données <i>in vitro</i>	37
1.4.2 Les données <i>in vivo</i> chez l'animal.....	38
1.4.3 Les données épidémiologiques	39
Chapitre 2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	50
Chapitre 3. LA CONTAMINATION PAR LES POLLUANTS NON PERSISTANTS	52
3.1 Mise au point d'une méthode analytique pour la mesure de polluants persistants et non persistants dans le cheveu	55
3.2 Distribution et comparaison des niveaux de contamination dans l'urine, le sang et le cheveu	68

Table des matières

Chapitre 4. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET DIABÈTE DE TYPE 2, ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE EN POPULATION LIÉGEOISE	87
4.1 Introduction.....	88
4.2 Matériel et méthode	92
4.2.1 Population de l'étude	92
4.2.2 Analyse des polluants.....	93
4.2.2.1 Les composés inclus dans l'étude.....	93
4.2.2.2 Les PFAS dans le sérum	93
4.2.2.3 Les PCB et 4,4'-DDE dans le sérum.....	94
4.2.2.4 Les phtalates, parabènes et benzophénone-3 dans l'urine	94
4.2.2.5 Les bisphénols et triclosan dans l'urine	94
4.2.2.6 Les métabolites des pesticides organophosphorés dans l'urine.....	95
4.2.3 Assurance qualité	95
4.2.4 Dosage de la créatinine, des lipides totaux et de l'hémoglobine glyquée.....	95
4.2.4.1 Ajustement par la créatinine et les lipides totaux.....	96
4.2.5 Analyses statistiques	97
4.3 Résultats et discussion	101
4.3.1 Caractéristiques de la population.....	101
4.3.2 Concentrations des polluants dans la population	103
4.3.3 Impact des méthodes d'ajustement des dosages	107
4.3.4 Associations entre les polluants et le statut diabétique	112
4.3.4.1 Analyses statistiques monopolluants	112
4.3.4.2 Modèles multipolluants.	114
4.3.4.3 Comparaison des résultats statistiques.....	124
4.3.4.4 Analyse des résultats statistiques.....	131
4.3.5 Conclusion	139

Table des matières

Chapitre 5. DISCUSSION	140
Chapitre 6. PERSPECTIVES.....	149
Chapitre 7. CONCLUSION	155
Bibliographie.....	161
Annexes	195

4,4'-DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
5-OH-MEHP	Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate
5-oxo-MEHP	Mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate
AhR	Récepteurs aryl d'hydrocarbone
AMAP	Arctic Monitoring and Assessment Program
AOP	Adverse outcome pathways
BKMR	Bayesian Kernel machine regression
BP-3	Benzophénone-3
BPA	Bisphénol A
BPAF	Bisphénol AF
BPAP	Bisphénol AP
BPF	Bisphénol F
BPS	Bisphénol S
BPZ	Bisphénol Z
CAS	Covariate-adjusted standardization
CHU	Centre hospitalo-universitaire
cx-MINCH	Cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-carboxylate-4-méthyl)heptyl ester
cx-MiNP	7-carboxy-(mono-méthyl-heptyl) phthalate
DAG	Directed acyclic graph
DAP	Dialkylphosphate
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEDTP	Diéthyldithiophosphate
DEHP	Diéthylhexylphthalate
DEP	Diéthylphosphate
DETP	Diéthylthiophosphate
DF	Fréquence de détection
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DINCH	Bis(7-méthyoctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate
DDMDTP	Diméthyldithiophosphate
DMTP	Diméthylthiophosphate
DT2	Diabète de type 2
ECHA	Agence européenne des produits chimiques
EP	Ethylparabène
EPA	Agence de protection de l'environnement
ER- α	Récepteur aux oestrogènes α
ER- β	Récepteur aux oestrogènes β
GC	Chromatographie en phase gazeuse
G-EQUAS	German External Quality Assessment Scheme for Analysis in Biological Materials
HbA1c	Hémoglobine glyquée
IA	Intelligence artificielle
IC 95 %	Intervalle de confiance à 95 %
ICC	Coefficient de corrélation intraclasse
IQR	Ecart interquartile
IMC	Indice de masse corporelle

INF-γ	Interféron gamma
INSPQ	Institut National de Santé Publique du Québec
KoNESH	Korean National Health Survey
LOQ	Limite de quantification
MBzP	Monobenzyl phtalate
MEHP	Mono-2-éthylhexyl phtalate
MeOH	Méthanol
MEP	Monoéthyle phtalate
MiBP	Mono-iso-butyl phtalate
MnBP	Mono-n-butyl phtalate
MP	Méthylparabène
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
n-BP	n-butylparabène
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NHS	Nurses' Health Study
NOAEL	Dose sans effets toxiques observés
nPOP	Polluant organique non persistant
OAT	Transporteur d'anions organiques
OH-MiDP	6-OH-mono-propyl-heptyl phtalate
OH-MINCH	Cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-hydroxy-4-méthyl)octyl ester
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Pesticide organophosphoré
OR	Odds ratio
OSEQUAS	External Quality Assessment Scheme for Organic Substances in Urine
P25	25e percentile
P50	Médiane
P75	75e percentile
PARC	Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals
PCB	Polychlorobiphényle
PE	Perturbateur endocrinien
PFAS	Substance per- et polyfluoroalkylée
PFDA	Acide perfluorodécanoïque
PFHpA	Acide perfluorohéptanoïque
PFhxA	Acide perfluorohexanoïque
PFhxs	Acide perfluorohexane sulfonique
PFNA	Acide perfluorononanoïque
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PFOS	Acide perfluorooctane sulfonique
PFUnDA	Acide perfluoroundécanoïque
PIP	Posterior inclusion probabilities
POP	Polluant organique persistant
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PrP	Propylparabène
PVC	Polychlorure de vinyle
SWAN-MPS	Study of Women's Health Accross The Nation Multi-pollutant Study

Liste des abréviations

TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCS	Triclosan
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
UHPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance
VAMS	Volumetric absorptive microsampler
WQS	Weighted quantile sum

Figure 1 : Exemple de courbe dose réponse non monotone, Hill. C 2018	20
Figure 2 : Structure chimique du DDT à gauche et du 4,4'-DDE à droite	22
Figure 3 : Structure chimique d'un polychlorobiphényle	23
Figure 4 : Structure chimique de l'acide perfluorooctane sulfonique et de l'acide perfluorooctanoïque	24
Figure 5 : Structure chimique du bisphénol A	26
Figure 6 : Structure du bisphénol F (gauche) et bisphénol S (droite)	28
Figure 7 : Structure chimique du triclosan	29
Figure 8 : Structure chimique de la benzophénone-3	29
Figure 9 : Structure des phtalates	31
Figure 10 : Structure chimique des parabènes où R est un groupement alkyl ou aryl.	33
Figure 11 : Structure chimique du a. diéthylphosphate, b. diméthylthiophosphate, c. diméthyldithiophosphate, d. diéthylthiophosphate, e. diéthyldithiophosphate.....	35
Figure 12 : Modèles de régression logistique pour les différentes méthodes d'ajustement par la créatinine.....	108
Figure 13 : Modèles de régression linéaire pour les différentes méthodes d'ajustement par les lipides.	110
Figure 14 : Poids des composés pour le modèle WQS incluant les polluants urinaires.....	115
Figure 15 : Poids des composés pour les modèles WQS incluant les polluants sériques....	116
Figure 16 : Poids des composés pour le modèle WQS incluant tous les polluants.....	117
Figure 17 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant les polluants urinaires...	118
Figure 18 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant les polluants sériques. ..	118
Figure 19 : Réponses individuelles pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques... ..	119
Figure 20 : Interactions entre les polluants pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques.	121
Figure 21 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant tous les polluants.....	122
Figure 22 : Réponses individuelles pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.....	122
Figure 23 : Interactions entre les polluants pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.	124
Figure 24 : DAG de l'étude incluant la fonction rénale et les médicaments (DAGitty)	138

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du 4,4'-DDE	22
Tableau 2 : Propriétés physicochimiques des PCB 28, 118,153	23
Tableau 3: Propriétés physicochimiques du PFOA, du PFOS et du PFHxS	24
Tableau 4 : Propriétés physicochimiques du BPA, du BPS et du BPF	28
Tableau 5 : Propriétés physicochimiques du triclosan	29
Tableau 6 : Propriétés physicochimiques de la BP-3	30
Tableau 7 : Propriétés physicochimiques de du diéthylphthalate, du dibutylphthalate et du DEHP	31
Tableau 8 : Propriétés physicochimiques du méthylparabène, de l'éthylparabène et du propylparabène	33
Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du chlorpyrifos, du malathion, du dichlorvos et du fenthion	34
Tableau 10 : Paramètres démographiques de la population	102
Tableau 11 : Résumé des concentrations pour les polluants urinaires	106
Tableau 12 : Résumé des concentrations pour les polluants sériques	107
Tableau 13 : Répartition des lipides mesurés chez les volontaires sains et diabétiques.	111
Tableau 14 : OR des modèles multivariés monopolluants pour les composés mesurés dans l'urine.....	113
Tableau 15 : OR des modèles multivariés monopolluants pour les composés mesurés dans le sérum.....	113
Tableau 16 : OR des modèles WQS	114
Tableau 17 : PIP pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques.	120
Tableau 18 : PIP pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.....	123
Tableau 19 : Comparaison des polluants mis en évidence comme significativement associés au diabète de type 2 par les différents modèles statistiques.	125

Equation 1 : Formule de Phillips.....	96
Equation 2 : Correction des concentrations urinaires par la créatinine.....	96
Equation 3 : Correction des concentration sériques par les lipides totaux.....	96
Equation 4 : Formule du CAS pour les polluants urinaires.....	97
Equation 5 : Formule du CAS pour les polluants sériques.	97
Equation 6 : Weighted Quantile Sum Regression.....	98

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1 Les produits chimiques à effets perturbateurs endocriniens.

En 1962, Rachel Carson décrit pour la première fois l'effet du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) sur le développement sexuel et la reproduction des animaux (notamment des oiseaux). A travers son livre « Le printemps silencieux », elle dénonce les effets de certains composés chimiques sur la faune et la flore (1). Cependant, pour les contemporains de R. Carson, ces observations se heurtent au principe de Paracelse selon lequel « seule la dose détermine si c'est un poison » et à l'idée que peu de composés synthétiques peuvent agir sur le système endocrinien (2).

Depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale, la production globale de produits chimiques a été multipliée par 50 (3). Ceux-ci sont destinés à diverses utilisations : agricoles, cosmétiques, constituants du plastique, médicaments, ... Tous ces composés se retrouvent par leurs usages, dans l'environnement général augmentant l'exposition des organismes vivants, animaux et Hommes. En parallèle, un accroissement de l'incidence de nombreuses maladies affectant le système endocrinien comme certaines anomalies de la fonction thyroïdienne, les troubles du métabolisme glucidique, de la fécondité ou encore certains cancers hormono-dépendants a été observée. Si l'amélioration des techniques de diagnostic permet d'expliquer en partie l'augmentation d'incidence de certaines pathologies et que les causes de ces maladies sont souvent multifactorielles, le nombre de preuves scientifiques établissant le lien entre la contamination chimique et l'impact sur la santé humaine est en constante augmentation (2).

Dans les années 1980, Theodora Colborn s'intéresse aux effets des polluants chimiques sur la santé de la faune sauvage des Grands Lacs aux Etats-Unis. Elle observe que de nombreuses espèces vivant dans cette région fortement contaminée souffrent de problèmes métaboliques, hormonaux, immunologiques et de la reproduction. Bien qu'à cette époque, le terme « perturbateur endocrinien » n'existe pas encore *sensu stricto*, la description des effets subis par la faune de cette région s'y apparente fortement. En 1991, sous l'impulsion de Theodora Colborn, a lieu la conférence de Wingspread où sont discutées les découvertes les plus récentes sur la contamination chimique et son influence sur le système endocrinien. C'est à l'occasion de cette conférence qu'est pour la première fois évoqué le terme de « perturbateur endocrinien » (PE) (4,5).

Après plus de cinq décennies de recherche, les perturbateurs endocriniens sont définis en 2002 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « Une substance ou un mélange exogène de substances qui altère les fonctions du système endocrinien et qui, en conséquence, cause des effets néfastes sur un organisme intact, sa progéniture ou une sous-population » (6).

Les effets des PE peuvent être produits par différents mécanismes d'action. Un PE peut se fixer directement sur le récepteur cellulaire ou nucléaire d'une hormone et y exercer un effet agoniste ou antagoniste. Les PE sont également capables d'interférer de manière plus complexe avec le système endocrinien. Outre l'activité directe sur les récepteurs, ils peuvent également perturber les processus métaboliques des hormones (synthèse, catabolisme), interférer avec les protéines de transport des hormones modifiant de ce fait la fraction libre (et donc active) de l'hormone dans l'organisme, ou encore affecter le génome humain par des modifications épigénétiques (7,8).

Certaines périodes de la vie sont plus vulnérables à la toxicité des perturbateurs endocriniens. La vie *in utero*, la petite enfance et la puberté sont les périodes les plus sensibles en raison de l'immaturité des systèmes hormonaux et des nombreuses modifications endogènes qui conduisent à la formation du système hormonal adulte. Une perturbation des actions hormonales lors de ces étapes du développement pourrait conduire à la création d'un système endocrinien défaillant à l'âge adulte et à l'apparition de pathologies (9,10). La toxicité des perturbateurs endocriniens est également insidieuse, les effets ne sont souvent visibles que plusieurs années après l'exposition voire sur plusieurs générations. De nombreux composés ont montré une toxicité multigénérationnelle ou transgénérationnelle (11). Les phtalates peuvent avoir des effets transgénérationnels sur la reproduction de rongeurs masculins (12). Chez l'Homme, l'exposition maternelle aux substances per et polyfluoroalkylées (PFAS) a été associée à un poids plus faible du nouveau-né à la naissance mais à un gain rapide en poids et en masse grasse dans les années suivant la naissance (13). Plusieurs autres études ont également mis en évidence un lien entre l'exposition aux PFAS durant la grossesse et des problèmes métaboliques chez l'enfant (14,15).

En Europe, plus de 100 000 substances chimiques sont répertoriées par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) et l'agence de protection de l'environnement (EPA) estime que plus de 10 000 composés chimiques sont des perturbateurs endocriniens potentiels. Toutes

ces substances se retrouvent un moment donné dans l'environnement exposant les organismes vivants à un grand nombre de substances chimiques de façon simultanée. Par conséquent, les effets de ces substances ne doivent pas être envisagés isolément mais il faut prendre en considération d'éventuelles interactions entre plusieurs substances. Un produit chimique peut en effet potentialiser l'effet d'un autre de façon additive ou synergique (effet agoniste) ou au contraire avoir un effet contraire à celui d'une autre substance (effet antagoniste). Cette interaction entre différentes molécules s'appelle « l'effet cocktail ». Cette propriété a initialement été mise en évidence par l'observation d'effets œstrogéniques après une exposition simultanée à huit composés œstrogéniques à doses considérées comme sans effet (16). Plus récemment, une autre étude a montré qu'une exposition à un cocktail de polluants en faibles concentrations menait chez la souris à des effets métaboliques semblables à une alimentation riche en graisse comme l'aggravation de l'intolérance au glucose, une perturbation de la signalisation des œstrogènes hépatiques ou encore une augmentation de l'inflammation dans les tissus adipeux alors que chaque polluant pris isolément n'avait aucun effet (17).

Les hormones endogènes agissant bien souvent à des concentrations de l'ordre du nanomolaire voir du picomolaire, les PE sont également susceptibles d'agir à de très faibles concentrations. Des effets toxiques pourraient ainsi déjà apparaître à des concentrations très faibles (18).

La toxicologie classique est basée sur une relation dose-effet linéaire, cependant la relation entre la concentration d'un produit chimique et l'observation d'effets endocriniens n'est pas toujours monotone ou proportionnelle. En effet, des relations dose-effet non linéaires ont été observées pour différents composés. Plusieurs tendances ont été décrites : premièrement, la courbe en U inversé, tout d'abord on observe une augmentation de l'effet toxique parallèlement à l'accroissement de l'exposition au toxique, ensuite l'augmentation de la concentration peut ne pas s'accompagner d'une majoration de l'effet toxique ou s'accompagner d'une diminution de ce dernier. Un produit chimique peut également posséder des effets toxiques à faible et haute concentration mais peu d'effets entre les deux (courbe en U). Les courbes non monotones changeant de pentes plusieurs fois en fonction des concentrations ont également été décrites (18).

Ces relations non monotones entre dose et effet peuvent également remettre en question la théorie des différents seuils de toxicité comme la dose sans effet toxique observé (NOAEL). Une molécule pourrait être responsable d'un effet toxique à une concentration inférieure à la NOAEL ou à la dose de référence établie par les autorités en raison d'un changement de cette relation comme montré dans la figure 1. Cette figure illustre un exemple de courbe non monotone en relation avec la dose NOAEL et la dose de référence. Dans les images C et D, on constate qu'il est possible d'observer un effet toxique sous ces seuils en raison d'un changement non monotone de courbe (19).

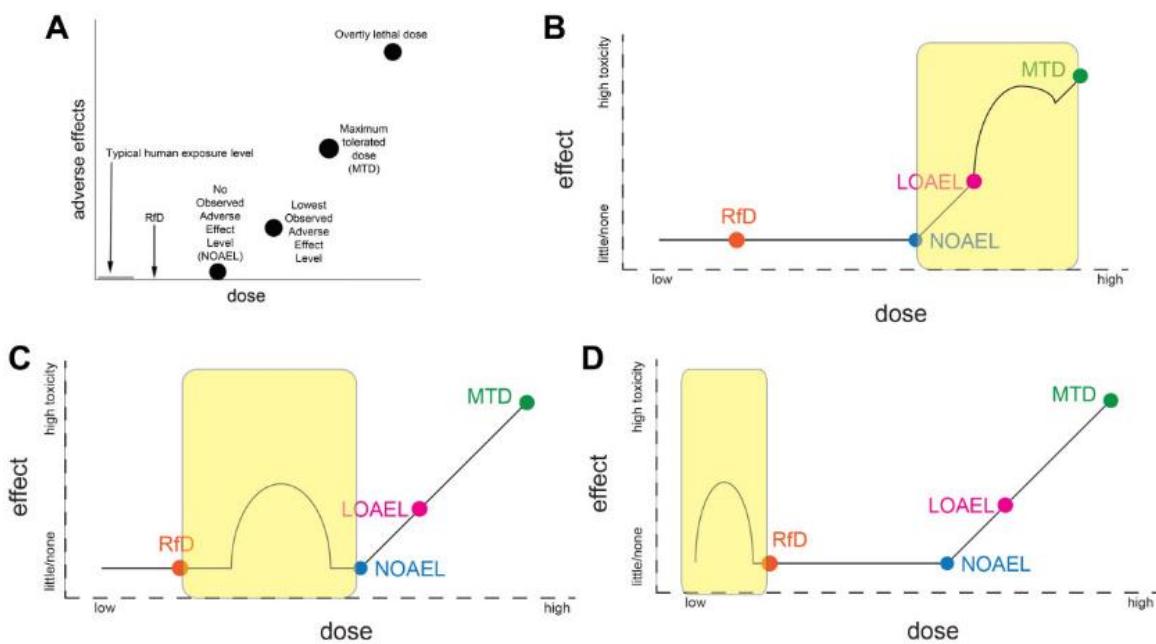


Figure 1 : Exemple de courbe dose réponse non monotone, Hill. C 2018

1.2 Les grandes familles chimiques de perturbateurs endocriniens.

Il existe une grande variété de composés chimiques suspectés de perturber le système endocrinien. On distingue d'une part les polluants organiques persistants (POP) et d'autre part les polluants organiques non persistants (nPOP).

1.2.1 Les composés organiques persistants

L'impact d'un produit chimique sur l'environnement s'apprécie au moyen de trois paramètres: la persistance, la bioaccumulation et la toxicité.

Les composés organiques persistants sont très peu dégradés dans l'environnement et ils sont capables de demeurer intacts durant de nombreuses années augmentant par conséquent leur toxicité potentielle pour la faune et l'Homme. Ils portent également le nom de polluants éternels (20). Ce type de composés, très stables dans les milieux naturels (eau, sols, poussières) peuvent être transportés sur de grandes distances par l'air ou les courants marins c'est-à-dire au gré des conditions climatiques. On peut observer la contamination de milieux très éloignés de leurs endroits de fabrication ou d'utilisation et ces polluants sont maintenant retrouvés de façon ubiquitaire autour du globe.

Le caractère lipophile de la plupart de ces composés leur permet de se fixer dans différents compartiments des organismes vivants, principalement dans les graisses. Leur concentration augmente tout au long de la chaîne alimentaire, c'est ce que l'on appelle la bioaccumulation (21–23).

Certains de ces composés ont été inventés il y a plus d'un siècle, comme le DDT qui a été synthétisé pour la première fois à la fin du XIX^e siècle. Cependant, l'utilisation massive de ces molécules chimiques remonte pour la plupart à la moitié du XX^e siècle. Nombre de ces composés sont de nos jours réglementés ou interdits par la Convention de Stockholm. Ce traité, qui a été écrit en 2001 et adopté en 2004, a pour objectif de protéger l'environnement et la santé humaine de l'exposition aux POP à travers diverses restrictions sur la fabrication et l'utilisation de produits chimiques à caractère persistant (20).

Il existe de nombreuses familles de POP dont la plus connue est certainement celle des pesticides organochlorés dont font partie l'hexachlorobenzène, l'aldrine, la dieldrine ou le

DDT. On peut également citer des composés de type dioxine, les polychlorobiphényles (PCB), ou encore des composés perfluorés.

1.2.1.1 Le dichlorodiphényltrichloroéthane

Le DDT est sans doute le plus connu des pesticides organochlorés. Le DDT est composé de deux cycles chlorobenzène reliés entre eux par un groupement trichloréthylène (figure 2). La force de liaison chlore-carbone ainsi que sa capacité à se bioconcentrer dans les tissus lipidiques des organismes vivants rendent cette molécule extrêmement stable dans l'environnement et les organismes (24,25). Synthétisé une première fois dans les années 1880, c'est en 1930 qu'on découvre les propriétés insecticides du DDT. A partir de 1945, il est largement utilisé à des fins agricoles et pour contrôler certaines maladies bactériennes et parasitaires véhiculées par des insectes comme le typhus ou la malaria (24,25). Dans les années 1970, du fait de sa toxicité probable pour l'Homme et de sa persistance dans tous les compartiments de l'environnement, le DDT fut interdit dans de nombreux pays dont la Belgique. C'est trente ans plus tard que le DDT fut inscrit avec 11 autres molécules (en majorité d'autres pesticides organochlorés) sur la liste des produits interdits à la Convention de Stockholm (26).

Dans l'organisme, le DDT est métabolisé en dichlorodiphényldichloroéthylène (4,4'-DDE) (figure 2) par oxydation de la liaison C-CCl₃ en double liaison carbone-carbone. Le tableau 1 présente les principales propriétés physicochimiques du 4,4'-DDE.

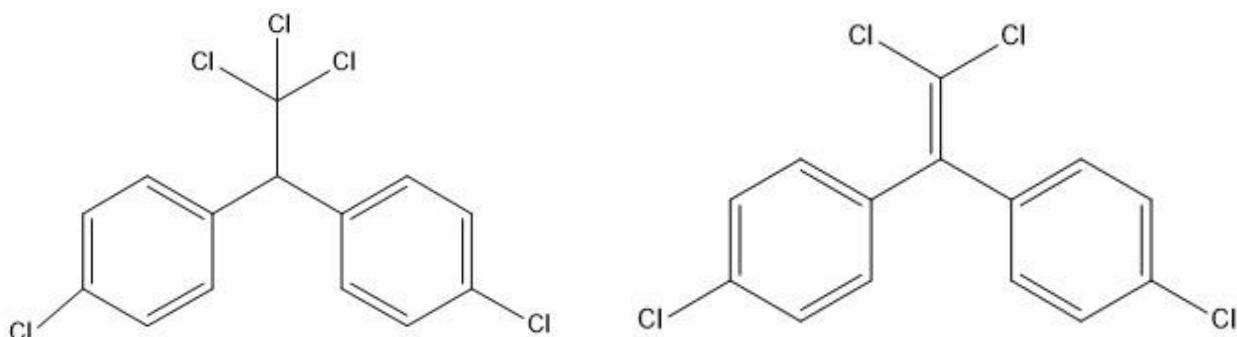


Figure 2 : Structure chimique du DDT à gauche et du 4,4'-DDE à droite

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
4,4'-DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0 g/mol	7	-

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du 4,4'-DDE (27)

Ce métabolite est lui aussi extrêmement stable avec une demi-vie biologique de près d'une dizaine d'années (27). Quarante ans après l'interdiction du DDT, la population wallonne est toujours contaminée par ce composé et son métabolite, exposant encore aujourd'hui les organismes à la toxicité de ces molécules (28).

1.2.1.2 Les polychlorobiphényles

Parmi les polluants persistants contrôlés par la Convention de Stockholm figurent les PCB. Produits à grande échelle à partir des années 1940, les PCB ont largement été utilisés comme isolants dans les transformateurs et condensateurs électriques en raison de leur résistance thermique et diélectrique. En plus de ces utilisations principales, les PCB ont également été utilisés dans les pesticides, comme retardateurs de flamme, dans les peintures, colles ou encres d'impression et comme isolants thermiques (29). Certains PCB sont également formés de manière involontaire lors de procédés industriels et relargués accidentellement dans l'environnement (30).

Obtenus à partir de benzènes fusionnés en diphényle et chlorés par la suite (figure 3), cette famille de polluants contient 209 congénères qui diffèrent en fonction du nombre d'atomes de chlore ainsi que de leur position sur les cycles aromatiques.

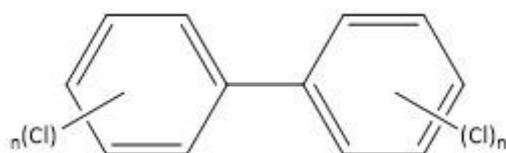


Figure 3 : Structure chimique d'un polychlorobiphényle

En fonction du nombre d'atomes de chlore présents sur les cycles, les PCB peuvent être classés en deux catégories : faiblement chlorés si la molécule comporte 4 atomes de chlore ou moins et fortement chlorés si la structure comporte plus de 4 atomes de chlore (31). Les propriétés physicochimiques de trois congénères (le PCB 28, le PCB 118 et le PCB 153) sont résumées dans le tableau 2.

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
PCB 28	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	257,5 g/mol	5,6	-
PCB 118	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	326,4 g/mol	7,1	-
PCB 153	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	360,9 g/mol	7,2	-

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques des PCB 28, 118, 153 (32-34)

Le nombre d'atome de chlore des cycles et leurs positions influencent les propriétés des composés, ainsi que les voies d'exposition principales à ces substances. Les PCB fortement chlorés sont plus résistants à la dégradation et à la métabolisation. Ils se concentrent aisément dans les graisses et l'Homme y est fortement exposé par l'alimentation notamment via les poissons gras. A contrario, les PCB peu chlorés sont semi-volatils et rapidement métabolisés.

On les retrouve principalement dans l'air intérieur et extérieur de grandes villes ou de zones industrielles (35). La demi-vie des PCB varie selon les congénères : elle est d'environ trois ans pour le PCB 28 et de près de douze ans pour le PCB 153 (36). Les PCB ont été bannis dans les années 1970 et leur production arrêtée durant cette même décennie dans la plupart des pays. Malgré plus de 40 années d'interdiction, leur forte résistance à la dégradation les rend toujours ubiquitaires dans l'environnement, contaminant ainsi les organismes vivants et les milieux naturels. De récentes données montrent des fréquences de détection de plus de 75 % dans la population wallonne pour plusieurs congénères (28,37), exposant toujours les individus au risque de maladies pouvant être favorisées par les PCB comme le diabète de type 2, des pathologies cardiovasculaires ou hépatiques ou encore un déficit cognitif (35).

1.2.1.3 Les substances per- et polyfluoroalkylées

Les PFAS sont définis comme des composés dont la chaîne aliphatique contient au moins un groupement méthyl ou méthylène complètement fluoré, à l'image des deux composés les plus étudiés dans la littérature : l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) (figure 4) et dont les principales caractéristiques physicochimiques ainsi que celles de l'acide perfluorohexane sulfonique (PFHxS) sont présentées dans le tableau 3 (38).

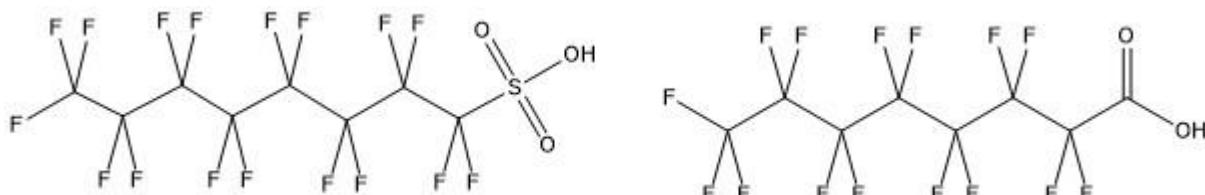


Figure 4 : Structure chimique de l'acide perfluorooctane sulfonique à gauche et de l'acide perfluorooctanoïque à droite

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	414,1 g/mol	4,9	-0,5
PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	500,1 g/mol	5	<1,0
PFHxS	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	400,2 g/mol	3,7	-0,45

Tableau 3: Propriétés physicochimiques du PFOA, du PFOS et du PFHxS (39–42)

Les PFAS sont des composés persistants dans l'environnement en raison de la stabilité de la liaison carbone-fluor de la chaîne aliphatique. Cette liaison rend les PFAS extrêmement résistants à la chaleur, à la dégradation chimique et à la photolyse. Leur nature lipophile à une extrémité et hydrophile à l'opposé de la chaîne aliphatique leur confère des propriétés tensio-actives responsables de nombre de leurs utilisations (43). Fabriqués depuis la moitié du XX^e siècle, les PFAS ont été utilisés pour diverses applications industrielles ou domestiques. On les

retrouve notamment dans les revêtements antiadhésifs d'ustensiles de cuisine, comme émulsifiants dans les mousses anti-incendie, comme produits imperméabilisants dans les textiles, ou encore dans les emballages alimentaires (44). Leur usage à grande échelle les a rendus ubiquitaires avec une dispersion possible sur de grandes distances. Les humains sont exposés aux PFAS à travers l'alimentation et l'eau potable, les poussières et par contact avec les produits contenant ce type de contaminants.

La capacité de bioaccumulation chez l'Homme et les organismes vivants dépend des propriétés de chaque molécule comme la longueur et conformation de la chaîne carbonée, ou le groupement fonctionnel présent en bout de chaîne. Les composés à plus longues chaînes sont les plus persistants et bioaccumulables, la demi-vie de ces molécules chez l'Homme est de plusieurs années, avec des variations selon les congénères (42). Contrairement à d'autres composés persistants qui se fixent surtout dans les graisses, les PFAS s'accumulent principalement dans le sang ou dans certains organes comme le foie et les reins en raison de leur affinité pour les protéines (45).

La contamination de l'environnement -la flore, la faune- ainsi que celle des humains est bien établie. On retrouve les PFAS dans tous les milieux de l'environnement (46). En Belgique, plusieurs études ont révélé que la population est largement exposée aux PFAS comme nous le montrent les données fournies par l'étude de 242 adultes vivant en Province de Liège chez lesquels plusieurs PFAS ont été mesurés pour certains dans plus de 99 % des échantillons (23). Du point de vue sanitaire, les effets potentiels des PFAS sur la santé humaine sont préoccupants. Il a été mis en évidence que les PFAS pouvaient perturber le système endocrinien avec des effets sur le développement, sur le métabolisme lipidique et glucidique, ils peuvent également provoquer une immunotoxicité, une hépatotoxicité ou une reprotoxicité (47,48). Le PFOA est catégorisé comme cancérogène pour l'Homme et le PFOS comme cancérogène humain probable depuis 2023 (49,50).

De nos jours, une pression constante sur les industriels a conduit à la diminution de la synthèse des PFAS. Le PFOS et le PFOA et le PFHxS sont maintenant inscrits à la Convention de Stockholm (51).

1.2.2 Les polluants chimiques non persistants

Les problèmes liés à la persistance dans l'environnement de certains composés chimiques ainsi que l'émergence d'une législation restrictive envers ce type de produits ont amené les industriels à se tourner vers des molécules de substitution, moins stables dans l'environnement et plus rapidement métabolisées par les organismes vivants. Ces substances sont à priori plus sûres pour la santé du fait de leur plus faible persistance et de leur moindre bioaccumulation. Cependant en raison d'une utilisation continue, ces substances chimiques sont parfois responsables d'une toxicité chronique équivalente à celle des dérivés persistants.

A la différence des POP, les polluants organiques non persistants sont plus hydrophiles. Ils sont en général rapidement métabolisés par les organismes vivants et éliminés sous forme de métabolites dans les urines dans les heures ou les jours qui suivent leur absorption.

Il existe différentes familles de polluants non persistants. On retrouve des pesticides comme les pyréthrinoïdes ou les pesticides organophosphorés, le glyphosate, des constituants des plastiques souples comme les phtalates ou rigides comme les bisphénols, des conservateurs entrant dans la composition de produits cosmétiques comme les parabènes ou le triclosan, ou certains filtres solaires comme la benzophénone-3. Dans ce travail, nous avons étudié les polluants non persistants suivants :

1.2.2.1 Les bisphénols

Les bisphénols sont une famille de composés chimiques dont la production a fortement augmenté ces dernières années. Le chef de file de cette famille, le bisphénol A (BPA) (figure 5), a été synthétisé pour la première fois au début du XX^e siècle. Initialement destiné à être utilisé comme médicament pour ses propriétés œstrogéniques, son usage médical sera cependant rapidement abandonné en raison d'un rapport bénéfice-risque défavorable (52).

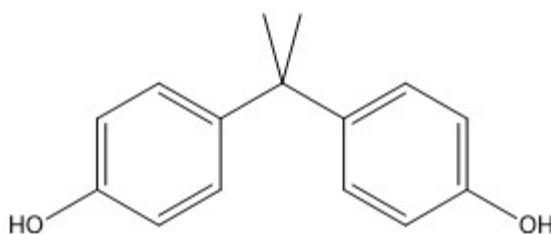


Figure 5 : Structure chimique du bisphénol A

Par contre, l'usage du BPA comme plastifiant se renforce tout au long du XX^e siècle en Europe et aux États-Unis d'Amérique. Le BPA est utilisé dans une large gamme de produits de

consommation dont les plastiques rigides de contenants alimentaires, les résines époxy de canettes et boîtes de conserves, les implants dentaires, les jouets ou encore les papiers à impression thermique (53). La migration du BPA depuis le contenant alimentaire vers la nourriture fait de l'alimentation la source principale d'exposition des humains à cette molécule (54).

Rapidement, de nombreux effets toxiques ont été imputés au BPA. En effet, la mise en évidence d'effets indésirables tels que des troubles de la reproduction, du métabolisme, du développement chez des rongeurs ont poussé à s'interroger sur sa toxicité potentielle pour l'Homme (55). Des études *in vitro* sur des cellules humaines et des études épidémiologiques ont alors confirmé les données de toxicité du BPA et ce dernier est aujourd'hui officiellement catégorisé comme perturbateur endocrinien (53). Le BPA a en effet une affinité pour les récepteurs des œstrogènes et androgènes ainsi que pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes (53,56). Du fait de ses effets néfastes, le BPA est soumis à de plus en plus de réglementations. Il est banni des biberons pour enfants, des papiers thermiques et soumis à des limites de migration dans les autres produits de consommation (57,58).

A cause de ces régulations, les industriels ont commencé à le remplacer par des molécules analogues comme le bisphénol S (BPS) et le bisphénol F (BPF). Ces substituts sont présents notamment dans les produits de consommation portant le label « BPA-free » donnant une fausse impression de sécurité au consommateur tandis que les profils toxicologiques des substituts au BPA n'ont pas été complètement étudiés. Les analogues du BPA sont des molécules de structure semblable dont les deux cycles phényles sont reliés entre eux par un radical différent, par exemple par un atome de soufre pour le BPS ou par l'absence des groupements méthyl sur le carbone entre les cycles phénols pour le BPF (figure 6). Les premières données toxicologiques montrent cependant un profil de toxicité semblable à celui du BPA avec une action hormonale identique et un effet perturbateur endocrinien (59). De plus, on reproche au BPS une toxicité sur le système immunitaire et le système neurologique (60). Les bisphénols sont généralement rapidement métabolisés par glucuro- et sulfoconjugaison, puis éliminés dans l'urine, avec une demi-vie comprise entre six et neuf heures après leur absorption (61–63). Le tableau 4 présente les principales propriétés physicochimiques du BPA, du BPS et du BPF.

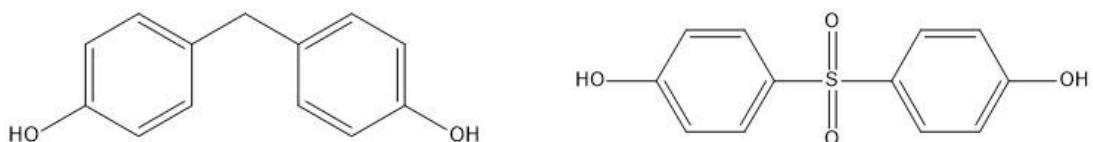


Figure 6 : Structure du bisphénol F (gauche) et bisphénol S (droite)

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,3 g/mol	3,3	9,8-10,5
BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	250,2 g/mol	1,9	7,4-8,0
BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	200,2 g/mol	2,9	9,8-10,5

Tableau 4 : Propriétés physicochimiques du BPA, du BPS et du BPF (64-67)

En Belgique, la population reste largement exposée à ce type de polluants comme le montrent les données du biomonitoring wallon réalisé en 2021 où 70 % des adultes présentaient des taux mesurables de BPA dans l'urine (37). La mise en application des restrictions d'utilisation du bisphénol A et son remplacement par ses substituts (BPS ou BPF) se traduisent dans la population par une diminution des concentrations urinaires en BPA et une augmentation de celles en BPS entre 2015 et 2018 (68).

1.2.2.2 Le triclosan

Utilisé pour la première fois au début des années 1970, le triclosan (TCS) ou 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phénol (figure 7) est un antimicrobien synthétique largement employé pendant 40 ans comme antiseptique, désinfectant ou conservateur dans les produits cosmétiques et d'hygiène (shampoing, savon, dentifrice, déodorant, lessive) ainsi que dans la fabrication du matériel médical (fils de sutures, cathéter). L'exposition humaine se fait principalement lors de l'utilisation de produits contenant du TCS. Le triclosan ayant contaminé divers compartiments de l'environnement comme les sols ou l'eau, l'Homme peut également être contaminé via l'alimentation générale ou l'eau potable (69). Les voies dermique et orale sont les deux voies principales de contamination pour l'Homme.

Après absorption, le TCS est rapidement glucuro- ou sulfoconjugué puis éliminé dans l'urine et dans les selles. La demi-vie du triclosan est estimée à 21 heures après une absorption orale (69,70). Les principales caractéristiques physicochimiques du triclosan sont résumées dans le tableau 5.

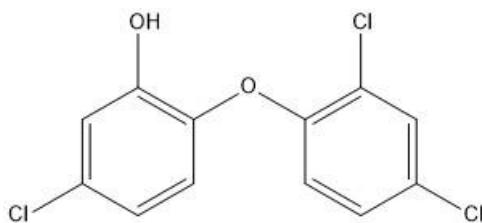


Figure 7 : Structure chimique du triclosan

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
Triclosan	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,5 g/mol	5	7,9

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques du triclosan (70)

Différents effets du triclosan sur l'organisme ont été décrits ces dernières années et les preuves d'une influence de ce composé sur la santé humaine sont aujourd'hui nombreuses. On observe une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC), une diminution de la fertilité, une perturbation des niveaux des hormones thyroïdiennes et de la morphologie des nouveau-nés à la naissance (poids, taille, circonférence du crâne), du stress oxydatif et un risque d'allergies respiratoire ou alimentaire (69).

En Europe, la concentration de triclosan autorisée dans différents produits de consommation est légiférée avec, par exemple, une concentration de maximum 0,3 % dans le dentifrice et 0,2% dans les bains de bouche pour adulte lorsqu'il est utilisé seul. Il est interdit dans les bains de bouche et dans les laits corporels pour enfants (71).

1.2.2.3 La benzophénone-3

La benzophénone-3 (BP-3) ou 2-hydroxy-4-methoxybenzophénone (figure 8) est un composé chimique utilisé comme filtre solaire dans les cosmétiques afin de minimiser les dommages causés par les radiations ultraviolettes du soleil sur la peau. Outre l'utilisation comme filtre solaire pour la peau, la BP-3 est également utilisée comme photo-stabilisant dans les produits cosmétiques, par exemple les vernis à ongles (72). Les caractéristiques physicochimiques principales de la BP-3 sont résumées dans le tableau 6.

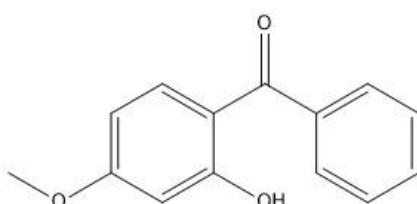


Figure 8 : Structure chimique de la benzophénone-3

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
BP-3	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,2 g/mol	3,6	7,1

Tableau 6 : Propriétés physicochimiques de la BP-3 (73)

Ces utilisations expliquent que la principale voie de contamination par la BP-3 est la voie dermique. Cependant, du fait de la présence de cette molécule dans l'environnement suite à la contamination des sols et de l'eau, les organismes vivants y sont également exposés par l'alimentation ou la consommation d'eau potable. Une fois absorbée, la BP-3 se distribue dans tout l'organisme. Son élimination se fait principalement dans l'urine après glucuroconjugaaison dans les 24 heures suivant son absorption (72). La BP-3 est détectée dans le sang, l'urine, le lait maternel et peut traverser la barrière hémato-encéphalique.

Les effets néfastes attribués à la BP-3 sont nombreux. Des effets sur la peau, les reins, le système endocrinien, hématologique et reproductif ainsi que sur le développement du fœtus durant la grossesse ont été décrits. Chez l'Homme, l'exposition à la BP-3 a notamment été associée à des anomalies de poids à la naissance, des perturbations des taux de masse grasse ou à des allergies respiratoires (72). La BP-3 pourrait également avoir un effet sur la qualité du sperme ainsi que sur le nombre d'ovocytes présents dans les ovaires. Un lien avec le développement de l'endométriose a également été décrit (72,74). La BP-3 est classée comme PE car elle possède une affinité pour les récepteurs aux stéroïdes et peut notamment influencer les taux de testostérone sanguin. D'autres fonctions du système endocrinien via la TSH et l'axe hypothalamo-hypophysaire peuvent également être perturbées par la BP-3 (74,75).

1.2.2.4 Les phtalates

Les phtalates sont une famille de substances chimiques produites à partir du début du XX^e siècle avec l'émergence du plastique. Ce sont des composés non volatils principalement utilisés comme adjutants dans la fabrication des plastiques de type polychlorure de vinyle (PVC) pour leur effet assouplissant. Les phtalates sont des esters de l'acide 1,2-dibenzènedicarboxylique (figure 9). Ils sont incolores, avec peu ou pas d'odeur, et sont caractérisés par une faible résistance à la chaleur (76).

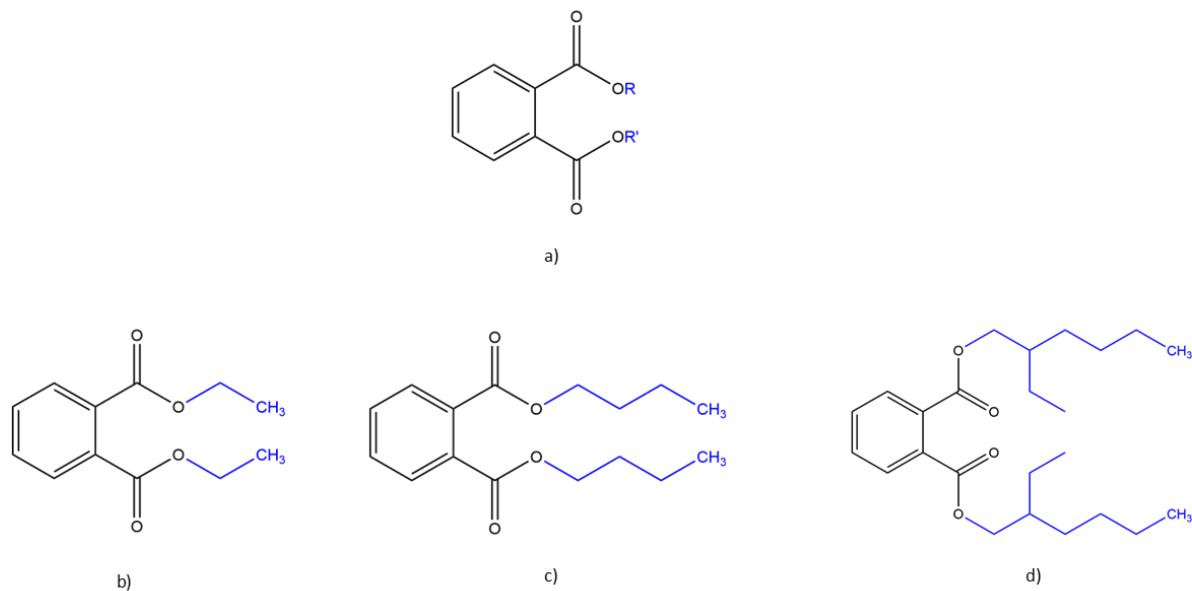


Figure 9 : Structure des phtalates a) structure générale des esters de l'acide 1,2- dibenzènedicarboxylique. R et R' peuvent être des groupements alkyl, benzyle, phényle, cyclo-alkyl ou alcoxyle ; b) diéthylphtalate ; c) dibutylphtalate ; d) diéthylhexylphtalate

Le diéthylhexylphthalate (DEHP), le dibutylphthalate, le diéthylphthalate font partie des phtalates les plus utilisés dans l'industrie du plastique. D'autres phtalates avec une chaîne liée plus courte et un poids moléculaire plus faible tels que le diméthylphtalate, ainsi que le diéthylphtalate sont également largement utilisés dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et dans la production de matériel médical, entre autres, pour la fabrication de tubes médicaux ou de poches (76). Le tableau 7 présente les caractéristiques physicochimiques principales du diéthylphtalate, du dibutylphtalate et du DEHP.

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa
Diéthylphtalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222,2 g/mol	2,5	-
Dibutylphtalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,3 g/mol	4,7	-
DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,6 g/mol	7,4	-

Tableau 7 : Propriétés physicochimiques du diéthylphtalate, du dibutylphtalate et du DEHP (77-79)

Les phtalates peuvent facilement être libérés depuis les différents produits de consommation, dans la nourriture, l'eau ou sur la peau, et les principales voies d'exposition de l'Homme à ces composés chimiques sont l'ingestion, l'inhalation ou le contact cutané avec des produits contenant des phtalates (80). Après leur absorption dans l'organisme, les phtalates sont rapidement métabolisés subissant d'abord une hydrolyse et ensuite une glucuro-conjugaison pour finalement être éliminés dans l'urine. Leur demi-vie est d'environ 12 heures (76). La

métabolisation de ces composés peut cependant différer d'un phtalate à l'autre en fonction de la chaîne liée et les métabolites formés peuvent être communs à plusieurs composés parents (81).

Ces dernières années, des effets toxiques potentiels ont été attribués aux phtalates. Chez l'Homme, on rapporte des effets perturbateurs endocriniens avec un impact sur la fertilité masculine et une toxicité ovarienne en plus des effets néfastes sur les fonctions neurologiques, cardiaques, gastro-intestinales et métaboliques (82). Les phtalates pourraient en effet exercer une activité sur différents récepteurs nucléaires comme les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) ou les récepteurs aux œstrogènes et aux récepteurs aux androgènes (83). Par conséquent, ces molécules sont suspectées de perturber l'ovulation ou encore la maturation des ovocytes chez la femme, la production de testostérone et la qualité du sperme (82).

L'utilisation des plastiques contenant des phtalates étant largement répandue, les phtalates se retrouvent de façon ubiquitaire dans l'environnement. La population y est largement exposée notamment en Belgique et en Wallonie où de nombreux métabolites de phtalates ont été détectés dans plus de 90 % des échantillons urinaires collectés en 2018 dans une population liégeoise qui avait pourtant été préalablement sensibilisée aux sources d'exposition potentielles à ces composés (68).

1.2.2.5 Les parabènes

Les parabènes sont largement utilisés dans différentes industries comme conservateurs antimicrobiens. Ils sont synthétisés et utilisés depuis les années 1920 et sont des esters de l'acide p-hydroxybenzoïque dont le radical ester est un groupement alkyl (méthyl, éthyl, phényl, propyl,...) ou aryl (benzyl, phényl) (figure 10) (84). Le tableau 8 résume les principales caractéristiques physicochimiques du méthylparabène, de l'éthylparabène et du propylparabène.

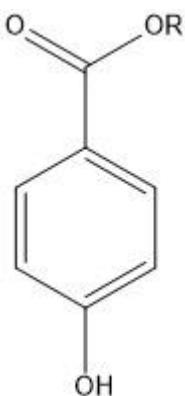


Figure 10 : Structure chimique des parabènes
où R est un groupement alkyl ou aryl.

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pKa	Demi-vie
Méthylparabène	C ₈ H ₈ O ₃	152,2 g/mol	2	8,5	10,5 h
Ethylparabène	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,2 g/mol	2,5	8,3	10,8 h
Propylparabène	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,2 g/mol	3	8,5	7,7 h

Tableau 8 : Propriétés physicochimiques du méthylparabène, de l'éthylparabène et du propylparabène (86-88)

Pour les industriels, les parabènes possèdent différents avantages : leur production est peu onéreuse, ils sont solubles dans l'eau et leur utilisation est pratiquement imperceptible car ils ne changent pas les propriétés organoleptiques des composés dans lesquels ils sont ajoutés (85).

Les parabènes ont une activité antifongique et antibactérienne et sont efficaces à différents pH. Les parabènes sont utilisés dans une grande variété de produits comme les médicaments et produits pharmaceutiques, la nourriture et les produits cosmétiques. Ils sont également présents dans certains emballages alimentaires (89).

Les parabènes ne sont cependant pas sans danger. Des effets sur la faune et sur l'Homme ont été observés. Chez l'Humain, on rapporte notamment des cancers du sein et une diminution de la fertilité qui s'expliquent par les effets perturbateurs endocriniens qui leur sont attribués. En effet, il semblerait que les parabènes soient des composés capables d'exprimer une activité œstrogénique et anti-androgénique (90,91). Les parabènes seraient également des composés obésogènes et pourraient perturber le métabolisme énergétique chez l'Homme (92).

La principale source d'exposition aux parabènes est l'utilisation de produits cosmétiques et pharmaceutiques et l'absorption dermique est la principale voie de pénétration de ces composés dans l'organisme. Les parabènes sont ensuite rapidement métabolisés et éliminés

dans l'urine dans les 12 heures suivant leur absorption (91). En 2018, le méthylparabène (MP) était détecté dans 83 % des échantillons urinaires d'une population wallonne, avec 62 % de positivité pour l'éthylparabène (EP) et 28 % pour le propylparabène (PrP) (68). En Europe, la quantité de parabène dans les produits cosmétiques est restreinte à 0,4% lorsqu'ils sont utilisés en mélange et 0,8 % lorsqu'ils sont utilisés seuls (68,93).

1.2.2.6 Les pesticides organophosphorés

Les pesticides organophosphorés (OP) sont des composés chimiques de synthèse comprenant au moins un atome de phosphore lié directement à un atome de carbone. Ils sont principalement utilisés comme herbicides ou insecticides. Ce sont de puissants agents neurotoxiques dont les congénères les plus dangereux sont utilisés comme gaz de combat (94). C'est le cas des gaz Sarin, du Tabun ou du Woman, des gaz appartenant à la « V séries » développés par les Anglais ou du Novichok développé en Union Soviétique durant la guerre froide (94,95).

Depuis les années 80, les OP ont progressivement remplacé les pesticides organochlorés en raison de leur moindre persistance. Les molécules les plus connues sont le chlorpyrifos, le malathion, le dichlorvos ou encore le fenthion dont les propriétés physicochimiques sont rapportées dans le tableau 9. Comme pour les autres pesticides, la population générale y est principalement exposée via la consommation de fruits et légumes traités mais également via la migration des OP dans les sols ou les eaux de surface ou souterraines (96). Un grand nombre d'OP sont désormais interdits d'utilisation en Europe, tels que le dichlorvos et le malathion qui sont interdits depuis plusieurs années (97,98). En 2020, la Commission Européenne a également interdit l'utilisation du chlorpyrifos ainsi que d'autres OP encore en usage en raison de leur toxicité avérée (99).

Molécule	Formule	Poids moléculaire	Log P	pkA
Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,6 g/mol	5,3	-
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,4 g/mol	2,4	-
Dichlorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	221,0 g/mol	1,4	-
Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,3 g/mol	4,1	-

Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du chlorpyrifos, du malathion, du dichlorvos et du fenthion (100–103)

Une fois pénétrés dans l'organisme par l'une des trois voies -digestive, respiratoire ou cutanée- les pesticides organophosphorés sont rapidement métabolisés par une série d'enzymes de détoxicification et éliminés dans l'urine en général dans les 24 heures après leur absorption (104,105). Les trois quarts des molécules sont métabolisées en six métabolites communs, les dialkylsphosphates (DAP) (figure 11). La concentration urinaire en DAP est généralement utilisée comme biomarqueur de contamination par les OP (106).

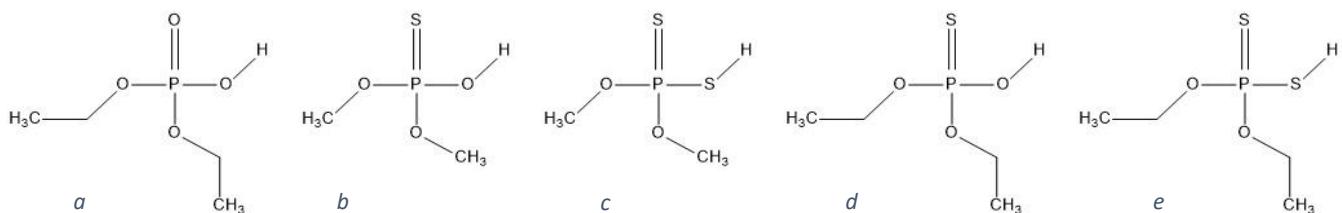


Figure 11 : Structure chimique du a. diéthylphosphate, b. diméthylthiophosphate, c. diméthylthiophosphate, d. diéthylthiophosphate, e. diéthylthiophosphate, cinq métabolites des organophosphates mesurés dans ce travail.

Les OP sont responsables d'une forte toxicité aigüe pour les différentes espèces vivantes par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase. La toxicité se caractérise par des effets neurotoxiques suivis d'un arrêt respiratoire pouvant conduire à la mort. Ces dernières années, du fait de la contamination générale de l'environnement par ce type de composé, il est apparu que les OP pouvaient également être responsables d'une toxicité chronique avec immunotoxicité, perturbation de la fertilité humaine, une tératogénicité, une augmentation du stress oxydatif ainsi que des effets perturbateurs endocriniens (107,108). Plusieurs études ont montré une action des OP sur l'homéostasie de l'axe hypothalamo-pituitaire-thyroïdien, de l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique et de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénergique (96,109). Les OP étant largement présents dans l'environnement, on retrouve leurs métabolites en quantité significative dans les prélèvements réalisés en population générale. En 2020, en Wallonie, deux des cinq métabolites des OP ont été retrouvés dans des échantillons urinaires d'enfants (73 % de positivité pour le diéthylphosphate (DEP) et 65 % pour le diméthylthiophosphate (DMTP)) démontrant que la population est exposée au risque toxique de ces composés dès le plus jeune âge (110).

1.3 Le métabolisme glucidique

Le métabolisme glucidique est une des cibles principales des effets toxiques causés par les produits chimiques à effets perturbateurs endocriniens. La conséquence d'une perturbation du métabolisme glucidique par les perturbateurs endocriniens est la survenue d'un diabète de type 2 (DT2).

Le diabète est un état chronique lors duquel on observe une hyperglycémie car l'organisme n'est plus capable de produire suffisamment d'insuline ou ne peut plus utiliser efficacement cette hormone pour maintenir une glycémie correcte.

Dans le monde, en 2021, l'OMS estimait que 537 millions de personnes souffraient de diabète, de type 2 dans 90 % des cas, soit environ 10,5 % des 20-79 ans. La prévalence devrait augmenter à 20 % d'ici 2045 (111). En Belgique aussi, on observe une augmentation du DT2. Selon les unions inter-mutualistes, en 2022, 7,1 % de la population souffrirait du DT2 contre 5,6 % en 2012. Les pays les plus touchés par cette pathologie sont les pays en voie de développement (111,112).

D'un point de vue physiologique, le DT2 est généralement caractérisé par deux anomalies touchant l'insuline : une résistance des tissus périphériques à l'insuline ainsi qu'un défaut de production de cette hormone (113). Dans un premier temps, l'insulino-résistance caractérisée par une diminution de la réponse et de la sensibilité des tissus périphériques (foie, muscles, tissus adipeux) à l'insuline ainsi que l'augmentation de la production de glucose hépatique stimulée par une production anormale de glucagon, rendent l'insuline incapable de réguler les taux de glucose sanguin (113,114). Pour tenter de maintenir la glycémie, le pancréas va augmenter la production d'insuline, on observe alors un hyperinsulinisme. Cependant, si cette situation perdure, la production d'insuline par les cellules β -productrices va s'épuiser et l'hyperglycémie va s'aggraver menant ainsi au DT2 (115). Le DT2 se développe généralement lentement et on observe dans les premières années de la maladie une hyperglycémie modérée qui est généralement non symptomatique. Cette absence de symptômes retarde bien souvent le diagnostic. Lorsque la maladie devient symptomatique, les principaux effets observés sont une polyurie, polydipsie, une altération de la vision et des troubles de la croissance chez les sujets jeunes (113,115).

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés. Le DT2 s'observe en général chez des populations plus âgées, mais des facteurs familiaux de type génétique, ou environnementaux comme la sédentarité et les excès alimentaires ont été identifiés (114,116,117).

1.4 Association entre diabète et PE

La proportion de la population souffrant de diabète est donc en forte augmentation. Parallèlement, on observe une diminution de l'âge moyen de l'apparition de la maladie. Le DT2, autrefois considéré comme le diabète de vieillesse, touche aujourd'hui de plus en plus d'adolescents (6). En effet, alors qu'en 1980, le DT2 était extrêmement rare chez les enfants, en 2014, un enfant sur 500 souffrait de cette pathologie (118). Les raisons de cette augmentation restent peu claires. Les facteurs de risques classiques mentionnés plus haut ne suffisent plus à complètement justifier cette augmentation d'incidence (119). D'autres explications sont avancées, parmi lesquelles, l'influence des produits chimiques à effets perturbateurs endocriniens est de plus en plus souvent mentionnée (120).

En effet, au cours de ces dernières années, de nombreuses études toxicologiques que ce soit *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal ont attiré l'attention des scientifiques sur les effets de polluants chimiques sur le métabolisme glucidique. A cela, se sont également ajoutées de plus en plus de données épidémiologiques.

1.4.1 Les données *in vitro*

Différentes études ont montré *in vitro* la capacité de certains polluants organiques à perturber le métabolisme glucidique. Ainsi, dès les années 1970, l'exposition de cultures cellulaires au DDT a montré une altération de la sécrétion d'insuline (121). C'est aussi le cas pour le BPA (122). Les études *in vitro* ont également permis de mettre en évidence l'action du BPA sur les récepteurs aux œstrogènes alpha (ER- α) et bêta (ER- β) et l'implication de la voie œstrogénique dans le métabolisme glucidique. Ces récepteurs semblent posséder une activité sur le quatuor de structures impliquées dans l'homéostasie du glucose : les cellules β du pancréas, les cellules musculaires, les cellules hépatiques et les adipocytes (123,124). D'autres plastifiants, les phtalates, ont montré une activité sur les récepteurs PPAR- α et PPAR- γ dans des cultures de cellules humaines et de souris (125). Les récepteurs PPAR sont impliqués dans le contrôle de la balance entre le stockage et la consommation d'énergie par l'organisme. Les récepteurs α jouent notamment un rôle important dans l'oxydation des acides gras alors que les récepteurs

γ agissent sur l'adipogenèse, le stockage des lipides et le contrôle de la sensibilité à l'insuline (126). Ces récepteurs sont également les cibles de certains PFAS, en effet, les données *in vitro* montrent que les substances perfluorées peuvent modifier l'activité des récepteurs PPAR (127). Ces substances ont également montré une activité toxique *in vitro* sur les cellules β de souris ou humaines ainsi qu'une perturbation du relargage d'insuline après la stimulation par le glucose (127).

Les résultats des études *in vitro* nous permettent de clarifier les mécanismes de perturbation du métabolisme glucidique. Ces données doivent cependant être confirmées sur des organismes entiers et par des données épidémiologiques.

1.4.2 Les données *in vivo* chez l'animal

De nombreuses études menées chez des animaux de laboratoire ont montré le potentiel diabétogène de plusieurs substances que ce soit des POP comme les PCB, les PFAS ou encore les pesticides organochlorés ou des nPOP comme les bisphénols ou les phtalates (128).

Ainsi, l'exposition chronique durant 30 jours à un cocktail de PCB a provoqué chez la souris un hyperinsulinisme et une aggravation de l'insulino-résistance. Le même cocktail durant 60 jours a montré les mêmes effets avec un gain pondéral et un hyperinsulinisme (129). L'exposition de rongeurs adultes au DDT et son métabolite le 4,4'-DDE a, quant à elle, montré un effet obésogène, et par conséquent une augmentation indirecte du risque de développer du diabète (130). Une équipe chinoise a mis en évidence que le PFOA induisait une dysfonction suivie de l'apoptose des cellules du pancréas sécrétrices d'insuline chez des souris à travers un effet sur les récepteurs aux œstrogènes de ces cellules (131). De plus, ces composés posséderaient une similitude avec la structure des activateurs naturels des récepteurs PPAR dont dépendent en partie la balance énergétique et l'homéostasie de la glycémie (132).

Le BPA a été associé à des perturbations de la sécrétion d'insuline par les cellules β, tandis qu'un de ses substituts, le BPS, a un effet sur les récepteurs PPAR (133,134). Le DEHP influencerait la sécrétion d'insuline ainsi que l'insulino-résistance notamment à travers une perturbation du stress oxydatif dans les muscles squelettiques menant à une insulino-résistance de ces structures (135,136). Concernant les pesticides organophosphorés, les conclusions des études ne sont pas concordantes, certaines observant des hyperglycémies, d'autres des hypoglycémies après une exposition à ce type de molécule (137). Toutefois, une

altération de la structure du pancréas et des vésicules contenant l'insuline dans les îlots β de Langerhans après une exposition de rongeurs aux composés organophosphorés a été démontrée, renforçant l'hypothèse que ces composés pourraient favoriser le diabète (138,139).

Il est également pertinent de mentionner que des modifications de certains biomarqueurs moléculaires précoces associés à des perturbations du métabolisme énergétique ont été corrélés à l'exposition à différents perturbateurs endocriniens. L'exposition au BPA a ainsi été associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6, le « Tumor necrosis factor α » (TNF- α) et l'interféron γ (INF- γ), à travers plusieurs voies métaboliques dont celle des adipocytes (140–143). D'autres études ont également montré que les niveaux de certains miRNA circulants, considérés comme des marqueurs précoces du dysfonctionnement des cellules β , de l'insulino-résistance et de l'élévation de l'hémoglobine glyquée, étaient associés à l'exposition à différents polluants de l'environnement dont le BPA et les phtalates (141,144).

1.4.3 Les données épidémiologiques

Les données issues de l'expérimentation animale ne sont pas directement extrapolables chez l'Homme du fait essentiellement de la différence entre la métabolisation du produit chimique chez l'animal et chez l'Homme, mais aussi en raison de la limitation de la durée des études chez l'animal ou encore de l'utilisation des produits chimiques à des concentrations sans rapport avec celles rencontrées lors des expositions environnementales. Les études épidémiologiques apportent donc des informations indispensables.

Les premières données liant les PE et le diabète ont été obtenues auprès de populations exposées de façon aiguë à de fortes concentrations de polluants. C'est ainsi que, au sein de la population vivant à proximité de l'usine chimique de Seveso en Italie, qui a été exposée à une quantité importante de composés de type de dioxine lors de l'explosion de l'usine, on a, plusieurs années après l'exposition, découvert un risque accru de développer un DT2 (145). De même, une étude menée sur les vétérans américains de la guerre du Vietnam exposés au 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), une dioxine contenue dans l'agent orange utilisé lors de l'opération Ranch Hand, a montré un risque accru de prévalence du diabète corrélé aux concentrations sériques en TCDD (146). Si ces études amènent des indices clefs sur

l'association entre la contamination par les polluants environnementaux et le DT2, elles ne reflètent cependant pas totalement le risque qu'encourt la population générale en raison des différences des niveaux d'exposition entre celle-ci et les deux populations mentionnées plus haut.

C'est pourquoi d'autres études se sont focalisées sur des populations exposées à des concentrations environnementales pour différents polluants. Certains travaux suivent des populations sur de longues périodes (les études longitudinales prospectives), c'est ainsi que les composés perfluorés ont été positivement associés au risque de DT2 dans la cohorte américaine « Study of Women's Health Across The Nation Multi-pollutant Study » (SWAN-MPS) incluant 1237 femmes suivies de 1999-2000 à 2017 (147). Des études transversales cas-contrôles, où les concentrations des polluants chez une population souffrant de diabète et celles mesurées dans une population constituée de volontaires sains sont comparées, sont également mises en place. Ainsi l'étude d'une population chinoise constituée de 502 paires cas-contrôles a mis en évidence des concentrations en BPA plus élevées chez les individus diabétiques (148). D'autres suivis ont mis en évidence un lien entre la contamination par le 4,4'-DDE ainsi que les PCB 118 et 153 avec le statut diabétique (149). Cependant, toutes les données recueillies ne convergent pas toujours vers les mêmes conclusions. Ainsi, alors que les PFAS ont été associés au risque de développer un DT2 dans certaines études, une association négative est parfois rapportée dans la littérature (132).

Ces données contradictoires sont en partie dues au fait que de nombreux paramètres et covariables influencent les résultats des études épidémiologiques. L'existence de courbes dose-réponse non monotones pourrait expliquer que différentes concentrations ne produiraient pas les mêmes effets chez les populations étudiées. En 2010 déjà, une étude coréenne mettait en évidence une relation non linéaire entre l'exposition aux PCB et le risque de diabète (150). De plus, certains paramètres des populations étudiées influencent non seulement le risque de souffrir de la maladie mais peuvent également impacter les concentrations mesurées de certains polluants. C'est par exemple le cas de l'IMC qui a d'une part une influence directe sur le risque de développer un DT2 mais également une influence sur la concentration sérique de certains polluants dont les PCB qui sont fortement lipophiles (151,152). Il est donc nécessaire de tenir compte de ces variables lors des analyses statistiques. D'autres facteurs confondants comme l'éducation, les origines ou le statut socioéconomique

peuvent à la fois expliquer l'exposition aux PE mais aussi le risque de diabète de façon générale. Ces paramètres doivent être inclus dans les modèles statistiques des études épidémiologiques (153).

Les différences observées entre les études pourraient également s'expliquer par le délai possible entre l'exposition à divers produits et l'apparition des symptômes. Les effets toxiques peuvent ne se manifester que de nombreuses années après l'exposition. Par exemple, l'exposition à des produits chimiques durant les premiers stades de la vie, comme la vie foetale ou la petite enfance, a été associée à diverses modifications des états métaboliques plus tard dans la vie. C'est la théorie du « *Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)* » (154). Plusieurs études ont mis en évidence l'impact de l'exposition pré-natale sur le DT2. L'exposition au BPA *in utero* et en période périnatale a été associée à l'apparition de diabète de type 2 plusieurs semaines après la naissance chez la souris et à d'autres perturbations métaboliques (155). Une autre étude a montré que l'exposition au DEHP pendant la grossesse était liée à une intolérance au glucose due à l'altération des cellules β des îlots de Langerhans plus tard dans la vie (156). Cela est dû à la capacité de certains produits chimiques à traverser la barrière placentaire et à affecter le foetus. Chez l'Homme également, l'exposition à différents polluants comme le 4,4'-DDE et le PFOA a été associée à des perturbations du métabolisme, comme l'augmentation de l'indice de masse corporelle ou le surpoids, plusieurs années après l'exposition (157). Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'exposition à divers produits peut également conduire à une perturbation du métabolisme énergétique et à une susceptibilité accrue au diabète de type 2 plusieurs années après l'exposition (157,158).

Les études diffèrent également par le nombre et la variété des substances étudiées. Souvent, les études épidémiologiques évaluent uniquement la contamination par type de polluants ou par famille de polluants, négligeant dès lors l'effet cocktail potentiel entre différents polluants. De nouvelles méthodes statistiques permettent d'apprécier avec plus de puissance l'importance de l'effet cocktail même si ces approches demeurent encore très complexes aujourd'hui (159,160). Il est par conséquent nécessaire de poursuivre les études explorant l'effet cocktail de plusieurs familles de polluants sur le diabète de type 2.

Enfin, évaluer correctement l'exposition humaine est parfois hasardeuse. Si, pour certains polluants comme les POP, l'analyse d'un échantillon sanguin reflète correctement la contamination accumulée au fil du temps, il est difficile de mesurer avec précision l'exposition

à des polluants dont la demi-vie métabolique est courte. Pour certains de ces composés, la demi-vie biologique n'est que de quelques heures et les concentrations dans les prélèvements biologiques varient fortement dans une même journée et l'analyse d'un échantillon reflète uniquement la contamination des moments précédent le prélèvement. Ceci peut évidemment influencer les résultats et les conclusions des études (161,162).

Le design des études peut également avoir un impact sur les résultats observés. Pour des raisons de facilité et de budget, de nombreuses études épidémiologiques sont transversales. Ce type d'étude ne permet pas de déterminer le sens de la causalité d'une association statistique. En cherchant à démontrer l'impact des polluants environnementaux sur le diabète, on ne peut exclure les conséquences de celui-ci sur les paramètres pharmacocinétiques qui caractérisent les polluants. Ainsi si une différence est mesurée entre les individus diabétiques et les volontaires sains, il sera impossible de distinguer si c'est une cause ou une conséquence de la maladie. L'étude transversale limite également le lien entre l'exposition et l'apparition de la maladie. Les concentrations mesurées lors de l'étude peuvent différer des concentrations auxquelles étaient exposés les individus lors du diagnostic de la pathologie étudiée. Les études longitudinales permettent de répondre en partie à certaines de ces limitations mais sont plus complexes à mettre en place.

Puisqu'il paraît impossible de démontrer avec certitude la causalité entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et l'apparition du diabète de type 2 à l'aide d'une seule ou d'une poignée d'études épidémiologiques, il convient de multiplier le nombre d'études afin de constituer la banque de données la plus large possible en agissant de manière à réduire au maximum les limitations de ces études.

Nous avons débuté ce travail par une revue de la littérature concernant le lien entre les perturbateurs endocriniens et le DT2. Une synthèse des données disponibles a fait l'objet d'une publication dans la Revue Médicale de Liège en 2021. Nous résumons dans cette publication le concept de perturbateurs endocriniens ainsi que leurs différents modes d'action dans l'organisme. Les données *in vitro*, *in vivo* et épidémiologiques liant différentes familles de molécules (bisphénols, parabènes, pesticides organophosphorés, POP et PFAS) et le DT2 y sont résumées.

Première publication

Le diabète de type 2 et les polluants chimiques de l'environnement à effet perturbateur
endocrinien.

J. Claessens, C. Charlier

Revue Médicale de Liège ; **76**, 2, 105-110 (2021)

LE DIABÈTE DE TYPE 2 ET LES POLLUANTS CHIMIQUES DE L'ENVIRONNEMENT À EFFET PERTURBATEUR ENDOCRINIEN

CLAESSENS J (1, 2), CHARLIER C (1, 2)

RÉSUMÉ : Les perturbateurs endocriniens sont des produits chimiques ou molécules naturelles capables d'interférer avec le système hormonal des organismes vivants. Ces polluants peuvent entraîner l'apparition de pathologies endocriniennes chez l'Homme ou chez l'animal. Dans cette publication, nous envisagerons le rôle possible de certaines familles de produits chimiques perturbateurs endocriniens sur l'apparition du diabète de type 2, pathologie dont la prévalence est en forte augmentation au niveau mondial.

MOTS-CLÉS : *Perturbateurs endocriniens - Diabète de type 2 - Polluants chimique - Perturbation métabolique*

TYPE 2 DIABETES AND ENDOCRINE DISRUPTING ENVIRONMENTAL CHEMICAL POLLUTANTS

SUMMARY : Endocrine disruptors are chemicals or natural molecules able to interfere with the hormonal system of living organisms. These pollutants can promote the emergence of diseases of the endocrine system in humans or animals. In this publication, we will focus on certain families of endocrine disrupting chemicals that may contribute to the development of type 2 diabetes, a disease whose prevalence is increasing strongly in the world.

KEYWORDS : *Endocrine disruptors - Type 2 diabetes - Chemical pollutants - Metabolism disruption*

Au cours des dernières décennies, la production et l'utilisation de produits chimiques à des fins agricoles, industrielles, médicales ou de développement économique n'ont cessé de croître, entraînant une augmentation très significative de la pollution de l'environnement associée à une exposition des individus et organismes vivants à ces polluants.

Les produits chimiques mis sur le marché peuvent exercer des effets toxiques sur les organismes vivants. L'étude de l'impact sur l'Homme ou la nature de l'exposition aux substances chimiques est l'objectif de la toxicologie environnementale. Parmi les effets toxicologiques liés à la présence de certaines de ces substances, on peut observer divers effets perturbateurs endocriniens (PE). Ce concept de perturbateur endocrinien fut introduit dans les années 1990 par Théodora Colborn qui, étudiant les effets des produits chimiques sur les hormones, postula que ces substances peuvent interagir avec les systèmes hormonaux des organismes vivants. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé une définition du PE comme étant «une substance (ou un mélange exogène de substances) qui altère les fonctions du système endocrinien et induit en conséquence des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact (ou) de ses descendants» (p.11) (1). De très nombreux produits possèdent un effet per-

turbateur endocrinien. Ce sont des molécules chimiques synthétiques, des hormones naturelles, des médicaments, des produits de l'industrie du plastique, des produits utilisés dans les revêtements antitâches ou imperméabilisants, des conservateurs antimicrobiens, des pesticides, etc. La présence pratiquement ubiquitaire de ces substances dans notre environnement nous expose quotidiennement à ces polluants. Ceux-ci peuvent contaminer les individus par les différentes voies d'absorption. La contamination de l'alimentation ou de l'eau potable concerne la voie de résorption digestive. L'absorption cutanée sera secondaire à l'application de produits cosmétiques, ou à l'utilisation de produits d'entretien. La voie pulmonaire correspond à l'inhalation de poussières contaminées (1, 2).

Des substances reconnues comme perturbateurs endocriniens avérés comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT, pesticide organochloré) ou les polychlorobiphényles (PCBs), sont interdites dans nos pays depuis plusieurs années. Mais leur capacité à se fixer dans les graisses et leur résistance aux mécanismes de dégradation naturelle les rendent persistantes dans l'environnement et dans les organismes vivants pendant plusieurs générations. D'autres substances comme les bisphénols ou les parabènes sont, à l'inverse, plus fragiles et rapidement dégradées dans l'environnement, ou métabolisées et éliminées par l'organisme dans les quelques heures suivant leur absorption. Mais malgré cette faible rémanence, l'omniprésence de ces substances (alimentation, produits cosmétiques), rapidement métabolisées et éliminées dans notre environnement, rend l'exposition des organismes vivants quasi permanente (2).

(1) Service de Toxicologie clinique, médico-légale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU Liège, Belgique.

(2) Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Département de Pharmacie, Liège Université, Belgique.

MODES D'ACTION

La toxicité des PEs résulte souvent de mécanismes biochimiques complexes d'interactions avec le système hormonal. Un PE peut agir directement sur le récepteur de l'hormone avec effet agoniste, antagoniste, agoniste partiel ou agoniste inverse. Le PE peut également interagir avec un récepteur orphelin (AhR) ou avec n'importe quelle protéine responsable de la libération, du transport ou de la production de l'hormone. Il peut également perturber la production et la signalisation des seconds messagers. À plusieurs reprises, on a montré que les PEs peuvent altérer le génome par des mécanismes épigénétiques et réguler l'expression de gènes. La toxicité des PEs ne repose pas sur un effet dose-dépendant, mais s'explique par une modification intrinsèque de l'homéostasie de l'organisme qui peut apparaître plusieurs années après l'exposition, et parfois se transmettre sur plusieurs générations. Enfin, on peut observer des effets sans seuil (où l'effet est dû à la seule présence du PE) ou encore des réponses «dose-effet» non linéaires (1, 2).

Pour comprendre les effets des PEs sur l'organisme, il faut aussi tenir compte de la fenêtre d'exposition de l'individu au polluant chimique. En effet, certaines périodes de la vie sont plus vulnérables aux effets des PEs en raison de l'immaturité des systèmes de l'organisme. Ces périodes correspondent à des moments (gestation, petite enfance) où les mécanismes hormonaux sont nombreux et déterminants pour le reste de la vie de l'individu (1, 2). L'étude de la toxicité des PEs doit également tenir compte de l'exposition à un grand nombre différent de substances chimiques qui peuvent être de structures ou de familles très éloignées, alors que leurs cibles sont identiques. Ces combinaisons de substances peuvent entraîner différents effets : additif, synergique, antagoniste, ou potentialisation de l'effet d'autres substances. Ces interactions entre plusieurs substances sont appelées «effet cocktail» (1).

À ce jour, il n'existe pas de classification officielle concernant la dangerosité des PEs et de leur risque pour la santé des individus. Mais, récemment, Karthikeyan et coll. ont proposé une classification en quatre catégories en fonction des indices témoins de leur toxicité. Leur action peut avoir été observée *in vivo* chez des êtres humains (catégorie I), *in vivo* chez des rongeurs et *in vitro* dans des expériences avec des cellules humaines (catégorie II), uniquement *in vivo* chez des rongeurs (catégorie III), uniquement *in vitro* avec des cellules humaines

(catégorie IV). Les substances de la catégorie I possèdent le plus haut niveau de preuve de toxicité. Ce niveau de preuve décroît ensuite jusqu'à la catégorie IV (3).

RELATION DE CAUSALITÉ ENTRE PE ET DIABÈTE DE TYPE 2

Aujourd'hui, la prévalence du diabète de type 2 (DT2) a fortement augmenté, dépassant largement les prévisions de l'OMS. Ainsi, en 2000, l'OMS estimait à 330 millions de personnes le nombre de diabétiques en 2030. Or, en 2014, 422 millions de personnes étaient atteintes de DT2 dans le monde (4). En Belgique, l'Institut scientifique de Santé publique Sciensano rapporte que 6,3 % de la population belge souffre de diabète. Cette maladie serait massivement méconnue et l'incidence réelle du diabète en Belgique serait de 10 %. Il existe aussi une répartition linguistique différente. La Wallonie serait plus touchée que Bruxelles et la Flandre, avec une incidence de 76 habitants/1.000. Enfin, en Wallonie, l'incidence du DT2 est la plus forte dans le bassin liégeois avec une incidence de 93 cas/1.000 habitants (5).

Le DT2 est une maladie métabolique endocrinie chronique complexe se caractérisant par une hyperglycémie résultant d'un déficit de sécrétion d'insuline, ou d'un déficit de son action ou, le plus souvent, de la combinaison des deux effets (6, 7). Les signes cliniques de la maladie diabétique sont généralement précédés d'un état de diminution de la tolérance au glucose, dénommé parfois pré-diabète. Sans prise en charge médicale avec adaptation de mesures hygiéno-diététiques, ou instauration d'un traitement médicamenteux, le DT2 peut mener à de multiples complications dont la rétinopathie, l'insuffisance rénale, des troubles circulatoires, une augmentation du risque d'infarctus du myocarde, la neuropathie (4).

L'augmentation de l'incidence du diabète observée ces dernières années dépend de causes complexes et multifactorielles. Les principaux facteurs de risques sont la malnutrition, l'obésité et le manque d'activité physique, mais seuls, ces facteurs ne peuvent pas expliquer une telle augmentation d'incidence ni l'apparition à un âge plus précoce de la pathologie. Depuis quelques années, certaines hypothèses relatives à des facteurs de risques «non conventionnels» favorisant le diabète ont suscité l'attention de nombreuses recherches. On citera l'influence du microbiote, le stress, la micro-nutrition ou les polluants chimiques à effet PE (8, 9). Cette der-

nière hypothèse est corroborée par des études *in vitro* chez l'animal ou sur culture de cellules humaines qui permettent d'identifier les cibles des PEs dans l'organisme. Les études épidémiologiques permettent, quant à elles, d'évaluer plus correctement l'influence des PEs sur l'état sanitaire d'une population.

Chez l'Homme, les différents indices suggérant une corrélation entre la contamination par les PEs et l'incidence croissante du diabète sont apparus à la suite d'une exposition accidentelle d'individus à différents polluants chimiques, notamment chez les vétérans de la guerre du Vietnam exposés durant les années 60 aux pesticides de type organochlorés (10). Une autre corrélation est soupçonnée chez une population exposée aux composés organiques polychlorés après l'incident de l'usine chimique de Seveso en Italie, population au sein de laquelle on observe également une augmentation de l'incidence du diabète (11). Enfin, plus récemment, différentes études réalisées sur la cohorte National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) aux Etats-Unis ont montré que les personnes souffrant de diabète présentent régulièrement des taux supérieurs à ceux relevés dans les populations témoins pour plusieurs polluants organiques persistants. En 2002, une première étude de corrélation sur cette cohorte, montre que 6 polluants chimiques PEs sont positivement associés au diabète (1). En 2007, cette cohorte a fait l'objet d'une nouvelle étude où plus de polluants organiques persistants sont étudiés. Les résultats montrent que l'exposition à différentes familles de composés (pesticides organochlorés, dioxines, PCB,...) peut favoriser l'émergence du diabète (12).

LES PRODUITS

POLLUANTS ORGANIQUES NON PERSISTANTS

Les polluants non persistants comprennent un très grand nombre de classes de composés chimiques (pesticides organophosphates) et composés plastifiants (bisphénols, phtalates), mais également des agents conservateurs antimicrobiens comme les parabènes.

BISPHÉNOL A

Le bisphénol A (BPA), qui est le plus étudié de tous les bisphénols, a été initialement développé pour ses propriétés pharmacochimiques en raison de ses caractéristiques œstrogéniques. Son utilisation pharmacologique a été abandonnée et le BPA fut récupéré par l'industrie pour ses

propriétés plastifiantes. Présent dans les plastiques rigides de type polycarbonate, les résines époxy des boîtes de conserves, les «compact discs», ou encore dans certains implants utilisés en dentisterie, le bisphénol est le produit chimique le plus fabriqué dans le monde. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la toxicité du bisphénol sur différents systèmes de l'organisme, notamment au niveau du système reproducteur. Le BPA possède des propriétés œstrogéniques qui lui permettent de se lier aux récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β dont la modulation de l'activité semble perturber le métabolisme du glucose (1).

Chez l'animal, le bisphénol entraîne une altération des mécanismes hormonaux et une souris exposée au BPA sur une longue durée développe une hyper-insulinémie et une anomalie des tests de tolérance au glucose (13). Parallèlement, toujours chez la souris, l'exposition au bisphénol A durant la gestation a montré des changements dans ses habitudes alimentaires et son métabolisme, ce qui suggère une influence du BPA sur les états métaboliques de l'organisme et sur l'apparition de pathologies associées (14).

En 2018, une étude réalisée en Chine montre que le taux de bisphénol A est plus élevé chez les sujets diabétiques par rapport aux individus non diabétiques (502 paires cas-contrôles) (15). Une autre étude, réalisée en Corée en 2013, montre une augmentation de la concentration en bisphénol A dans la population diabétique. Après ajustement des résultats, l'odds ratio du risque de développer un diabète se montre supérieur pour les parties de population les plus contaminées par le BPA, sans cependant révéler une association positive et significative franche (16). En 2014, une étude américaine sur la cohorte Nurses' Health Study suggère que l'exposition au bisphénol A peut être associée à un risque accru de développer un DT2 (17).

LES PARABÈNES

Les parabènes sont des composés largement utilisés, notamment comme agents conservateurs antimicrobiens dans les cosmétiques, les médicaments, ou encore l'alimentation. La toxicité de ces composés chimiques a été de plus en plus étudiée en raison de leur utilisation massive dans différents secteurs, même si les données épidémiologiques sont relativement peu nombreuses. Au niveau de leur action sur le système endocrinien, les parabènes posséderaient des propriétés œstrogéniques, ce qui pourrait modifier le métabolisme du glucose (18).

En 2018, une étude a montré que les concentrations en parabènes étaient supérieures dans la population diabétique par rapport à la population non diabétique (19). Une autre étude a suggéré que les parabènes constituaient un facteur de risque de développer un diabète gestationnel. L'éthylparabène serait la substance la plus incriminée (20).

Dans une population de 27 patients, il a été montré que les taux de méthylparabène et de parabènes totaux étaient associés à la concentration de messagers intervenant dans la régulation de la balance énergétique, comme certaines adipokines, suggérant une action obésogène des parabènes (21).

LES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS

L'utilisation de pesticides organophosphorés appartenant à la famille des polluants organiques non persistants a fortement augmenté, en alternative aux pesticides organochlorés de forte rémanence, notamment dans les milieux agricoles. Une exposition aiguë aux organophosphorés entraîne une hyperglycémie. Qu'en est-il des effets d'une exposition chronique et sub-chronique sur le métabolisme du glucose ? Le malathion, chef de file des organophosphorés, peut augmenter la concentration sanguine de glucose et d'insuline ainsi que modifier le fonctionnement d'enzymes responsables de la glycogénolyse, de la glycolyse et de la néoglucogenèse (22).

Chez l'animal, la contamination par les organophosphorés peut conduire au gain de poids, affecter le métabolisme du glucose et le fonctionnement des enzymes clés du métabolisme glucidique. Une équipe multi-disciplinaire de l'Université d'Anvers s'est intéressée à cette problématique il y a quelques années. Elle a montré un risque accru d'adiposité viscérale (23), une atteinte de l'insulinosécrétion (24) et une augmentation de l'insulinorésistance (25). Tous ces facteurs augmentent le risque de développer un DT2.

Diverses études épidémiologiques témoignent de l'influence des organophosphorés sur la santé publique. En Thaïlande, l'exposition aux pesticides organophosphorés est accusée de favoriser l'émergence du diabète (26). Chez des épouses de fermiers américains, l'exposition à trois pesticides organophosphorés accentue le risque de développer une modification du métabolisme glucidique (27). En 2012, une étude chez des fermiers égyptiens a montré une corrélation positive entre le malathion et l'insulinorésistance (28). En Iran, une étude épidémiologique a établi que le nombre d'années

d'exposition aux organophosphorés était corrélé aux anomalies du test de tolérance au glucose (29).

Cependant, la métabolisation et l'élimination rapide par l'organisme des dérivés organophosphorés diminuent le temps d'exposition, ce qui constitue une difficulté d'évaluation de la contamination chronique lors d'un biomonitoring ou d'une étude épidémiologique. Aussi, il faut faire preuve d'une grande prudence dans l'interprétation des études disponibles chez l'animal et chez l'Homme (2).

POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS

Parmi les polluants organiques persistants (POPs) les plus étudiés, on peut citer les composés polychlorés organiques tels que les dioxines, les diphényles polychlorés (PCBs) ou encore le DDT. Bien que l'utilisation de ces composés soit interdite dans nos pays depuis plusieurs années, ceux-ci restent des polluants majeurs pour l'Homme en raison de leur très faible élimination (1).

Quel lien peut exister entre la présence de dérivés organochlorés et le diabète de type 2 ?

L'influence des PCBs sur le métabolisme glucidique se traduit par la perturbation de la sécrétion d'insuline liée à l'altération du fonctionnement des cellules β des îlots de Langerhans. Une exposition chronique aux POPs pourrait également favoriser une insulinorésistance (30).

Les premières données épidémiologiques concernant l'exposition aux polluants chlorés et le DT2 ont été rapportées par l'étude de la population ayant subi la guerre du Vietnam et par celle ayant dû affronter l'accident chimique de Seveso (8, 9). En 2020, une étude a montré que la concentration en PCB était plus élevée chez une population diabétique que chez les volontaires sains (31). Ces résultats sont en accord avec ceux observés en Espagne où le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène), les PCBs 118 et 153 ont été corrélés au DT2. Lors de cette même étude, les auteurs ont pu associer le DDE à un taux de glucose à jeun supérieur à la valeur de référence (32). Sur cette base, l'hypothèse selon laquelle l'exposition aux composés organochlorés persistants peut favoriser l'émergence du DT2 est réaliste.

LES COMPOSÉS PERFLUORÉS

Cette famille de composés chimiques est divisée en différentes sous-familles, les perfluorés carboxyles, les perfluorés acides, ou encore, les perfluorés sulfonés. Ces composés perfluorés tensio-actifs sont utilisés dans l'industrie

textile comme imperméabilisants, composés antitaches ou anti-adhérents. On en retrouve également dans les peintures, cosmétiques ou mousse anti-flammes. Les PFCs sont des produits très rémanents, ce qui laisse envisager une toxicité chronique.

Les données épidémiologiques montrant une relation entre les composés perfluorés et le DT2 sont assez rares. Ces composés chimiques posséderaient une similitude de structure avec les activateurs des récepteurs PPAR, récepteurs dont dépendent la balance énergétique de l'organisme, le métabolisme des lipides ainsi que l'homéostasie de la glycémie (33). Une exposition à de petites doses de PFCs semble augmenter sensiblement les niveaux sériques d'insuline (34). L'exposition d'un individu au perfluorooctanesulfonique (PFOS) dans les stades précoce de développement et pendant la gestation pourrait produire de l'intolérance au glucose et de l'insulinorésistance (35).

En 2018, une étude prospective réalisée sur la cohorte Nurses' Health Study II montre une association positive entre le risque de développer un DT2 et la contamination par le PFOS et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) (36). Ces résultats renforcent les conclusions de Christensen et coll. qui montrent que plusieurs composés de la famille des PFCs sont associés au diabète et pré-diabète (37). Mais d'autres résultats conduisent à des observations différentes, comme le montre l'étude de Donat-Vargas et coll. qui a montré une corrélation inverse (33).

CONCLUSION

L'incidence des maladies métaboliques endocrines comme le DT2 n'a cessé de croître ces dernières années. Cette augmentation ne pouvant simplement être expliquée par des modifications des habitudes de vie et alimentaires, la piste d'autres facteurs de risques est privilégiée. L'exposition à différents polluants chimiques a également augmenté drastiquement depuis le début de l'ère industrielle, faisant de l'exposition aux polluants chimiques à effet PE l'une des hypothèses justifiant l'augmentation du DT2 dans la population.

L'implication des PEs dans la physiopathologie du DT2 a été de nombreuses fois étudiée *in vivo* et *in vitro*, permettant d'apprécier le rôle et les cibles des PEs dans l'organisme. Cependant, démontrer formellement l'implication des PEs dans la physiopathologie du diabète reste très compliqué. En effet, lors de l'interprétation des résultats d'étude, il faut veiller à ne pas

confondre corrélation et causalité, mais également tenir compte de la grande variété de substances chimiques auxquelles l'organisme est exposé.

Enquêter sur l'effet des produits PE sur la prévalence du diabète est donc un objectif pertinent en termes de santé publique et une étude cas-témoins avec cet objectif a débuté dans notre service hospitalo-universitaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bergman A, Heindel J, Jobling S, et al. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett* 2012;211:1-342.
2. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, et al. EDC-2 : the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2015;36:1-150.
3. Karthikeyan BS, Ravichandran J, Mohanraj K, et al. A curated knowledgebase on endocrine disrupting chemicals and their biological systems-level perturbations. *Sci Total Environ* 2019;692:281-96.
4. Organisation Mondiale de la Santé . Rapport Mondial sur le diabète. Disponible en ligne : <https://www.who.int/diabetes/global-report/fr/>. Dernière consultation le 16/11/2020.
5. Agence InterMutualiste Atlas. Prévalence du diabète 2017. Disponible en ligne : <https://atlas.aima.be/base-de-donnees/?rw=1&lang=fr>. Dernière consultation le 16/11/2020.
6. Féry F, Paquot N. Etiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2. *Rev Med Liège* 2005;60:361-8.
7. Scheen AJ, Paquot N. Le diabète de type 2 : voyage au cœur d'une maladie complexe. *Rev Med Liège* 2012;67:326-31.
8. Neel BA, Sargis RM. The paradox of progress : environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* 2011;60:1838-48.
9. Féniichel P, Chevalier N. Environmental endocrine disruptors: New diabetogens? *C R Biol* 2017;340:446-52.
10. Institute of Medicine. Veterans and agent orange : herbicide/dioxin exposure and type 2 diabetes. Washington (DC):National Academies Press (US);2000.
11. Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, et al. Health effects of dioxin exposure : a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* 2001;153:1031-44.
12. Lee DH, Lee IK, Steffes M, Jacobs DR. Extended analyses of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1596-8.
13. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, et al. The estrogenic effect of bisphenol a disrupts pancreatic β -cell function *in vivo* and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006;114:106-12.
14. Angle BM, Do RP, Ponzi D, et al. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA) : evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol* 2013;42:256-68.
15. Duan Y, Yao Y, Wang B, et al. Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus : a case-control study. *Environ Pollut* 2018;243:1719-26.
16. Kim K, Park H. Association between urinary concentrations of bisphenol A and type 2 diabetes in Korean adults : a population-based cross-sectional study. *Int J Hyg Environ Health* 2013;216:467-71.

17. Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes : a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect* 2014;**122**:616-23.
18. Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 2010;**30**:301-12.
19. Li AJ, Xue J, Lin S, et al. Urinary concentrations of environmental phenols and their association with type 2 diabetes in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ Res* 2018;**166**:544-52.
20. Liu W, Zhou Y, Li J, et al. Parabens exposure in early pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Environ Int* 2019;**126**:468-75.
21. Šramková M, Kolářová L, Vítků J, et al. Parabens and their relationship to obesity. *Physiol Res* 2018;**67**:465-72.
22. Rezg R, Momaqui B, El-Fazaaz S, Gharbi N. Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes : a review. *Trends Food Sci Technol* 2010;**21**:345-57.
23. Dirinck EL, D'Urso AC, Govindan M, et al. Exposure to persistent organic pollutants : relationship with abnormal glucose metabolism and visceral adiposity. *Diabetes Care* 2014;**37**:1951-8.
24. Hectors TL, Vanparys C, van der Ven K, et al. Environmental pollutants and type 2 diabetes : a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia* 2011;**54**:1273-81.
25. Hectors TL, Vanparys C, Van Gaal LF, et al. Insulin resistance and environmental pollutants : experimental evidence and future perspectives. *Environ Health Perspect* 2013;**121**:1273-81.
26. Juntarawijit C, Juntarawijit Y. Association between diabetes and pesticides : a case-control study among Thai farmers. *Environ Health Prev Med* 2018;**23**:1-10.
27. Starling AP, Umbach DM, Kamel F, et al. Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2014;**71**:629-35.
28. Raafat N, Abass MA, Salem HM. Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin Biochem* 2012;**45**:1591-5.
29. Malekirad AA, Faghih M, Mirabdollahi M, et al. Neurocognitive, mental health, and glucose disorders in farmers exposed to organophosphorus pesticides. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;**64**:1-8.
30. Lee YM, Ha CM, Kim SA, et al. Low-dose persistent organic pollutants impair insulin secretory function of pancreatic b-cells: Human and *in vitro* evidence. *Diabetes* 2017;**66**:2669-80.
31. Han X, Meng L, Li Y, et al. Associations between the exposure to persistent organic pollutants and type 2 diabetes in East China : a case-control study. *Chemosphere* 2020;**241**:1-8.
32. Henríquez-Hernández LA, Lizardo OP, Valerón PF, et al. Persistent organic pollutants and risk of diabetes and obesity on healthy adults : results from a cross-sectional study in Spain. *Sci Total Environ* 2017;**607-8**:1096-102.
33. Donat-Vargas C, Bergdahl IA, Tornevi A, et al. Perfluoroalkyl substances and risk of type II diabetes : a prospective nested case-control study. *Environ Int* 2019;**123**:390-8.
34. Hines EP, White SS, Stanko JP, et al. Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluoroctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice : low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. *Mol Cell Endocrinol* 2009;**304**:97-105.
35. Wan HT, Zhao YG, Leung PY, Wong CKC. Perinatal exposure to perfluoroctane sulfonate affects glucose metabolism in adult offspring. *PLoS One* 2014;**9**:1-12.
36. Sun Q, Zong G, Valvi D, et al. Plasma concentrations of perfluoroalkyl substances and risk of type 2 diabetes : a prospective investigation among U.S. women. *Environ Health Perspect* 2018;**126**:1-10.
37. Christensen KY, Raymond M, Thompson BA, Anderson HA. Perfluoroalkyl substances in older male anglers in Wisconsin. *Environ Int* 2016;**91**:312-8.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées à
Mr J. Claessens, Service de Toxicologie, CHU Liège, Belgique.
Email : Julien.claessens@uliege.be

Chapitre 2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'exposition aux produits chimiques est ubiquitaire et concerne toute la population. Les études menées *in vitro* et *in vivo* en laboratoire ont montré que certains de ces composés chimiques à effets perturbateurs endocriniens exercent une influence sur le métabolisme du glucose et sur l'apparition du DT2.

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'étude de l'influence de certains produits chimiques perturbateurs endocriniens sur l'incidence du diabète de type 2 en essayant de prendre en compte au mieux les diverses limitations des études épidémiologiques transversales.

Ce travail comprend plusieurs parties :

1. Pour les POP, mesurer la contamination dans un échantillon sanguin est bien adapté pour évaluer l'exposition chronique. Cependant, pour les polluants non persistants, le choix de l'échantillon à prélever est plus difficile. Si la plupart des études épidémiologiques ont recours à l'analyse d'un prélèvement unique d'urine, ce choix n'est pas parfait en raison de la grande variabilité des concentrations dans ce milieu, parfois pour un même individu. D'autres travaux font appel à l'analyse de prélèvements urinaires réalisés sur 24 heures ou sur plusieurs jours, mais cette approche rend très compliqué le recrutement de volontaires. Enfin, depuis quelques années, des publications ont proposé d'utiliser le cheveu comme matrice biologique.
Nos premiers essais ont consisté à comparer les informations apportées par l'analyse de polluants non persistants dans différentes matrices.
2. Nous avons mené une étude visant à rechercher l'éventuelle association entre l'exposition à plusieurs polluants à effets perturbateurs endocriniens et la survenue du DT2.
3. Nous avons investigué les conséquences de l'exposition simultanée à de multiples polluants en utilisant des modèles statistiques appropriés.

Chapitre 3. LA CONTAMINATION PAR LES POLLUANTS NON PERSISTANTS

Pour mettre en évidence la contamination d'individus lors d'études épidémiologiques, différents outils sont à notre disposition. Nous pouvons avoir recours à des questionnaires sur les habitudes de vie susceptibles d'influencer l'exposition aux contaminants ou apprécier indirectement la contamination de l'environnement par les produits chimiques en les quantifiant par exemple, dans les poussières de maison, les denrées alimentaires, ou le sol de différentes localisations. Cependant, la méthode que nous pensons la plus pertinente consiste à mesurer les concentrations des polluants directement dans les matrices biologiques comme le sang, l'urine, le lait maternel, les graisses, etc.

Utilisé depuis de nombreuses années, le sang est en général considéré comme la matrice de référence notamment en raison de son contact avec tous les tissus du corps humain. Cette matrice est particulièrement adaptée pour le biomonitoring des composés persistants comme les PCB ou les PFAS pour lesquels la mesure d'un seul échantillon sanguin reflète en général la contamination cumulée sur plusieurs années pour ce type de composés (161–163).

Lors de nos recherches bibliographiques, nous avons constaté que plusieurs polluants potentiellement diabétogènes appartenaient à la famille des polluants non persistants. Le biomonitoring de ce genre de composés se fait en général en mesurant la concentration de ces polluants ou de leurs métabolites dans l'urine. Cette méthode de biomonitoring présente certains avantages, comme la facilité de recueillir les échantillons. Cependant, la variabilité intra-individuelle des concentrations en nPOP dans cette matrice peut être une source de biais lorsque l'on vise à mettre en évidence le lien entre les concentrations urinaires des polluants avec une pathologie (161). Dans le but de réduire l'impact de la variabilité des concentrations, différentes stratégies ont été mises en place afin de mettre en évidence la contamination globale des individus par les nPOP. Certains auteurs ont étudié l'utilisation de la collecte des urines de 24h ou de plusieurs échantillons urinaires recueillis sur plusieurs jours (164,165). Cependant ces stratégies ne garantissent pas une réduction suffisante de la variabilité intra-individuelle pour certains composés comme les bisphénols. De plus, ces types de prélèvements sont beaucoup plus contraignants à récolter ce qui représente un frein à la participation de volontaires aux études.

Dès lors, une autre solution proposée est l'utilisation de matrices alternatives comme les cheveux ou les ongles afin d'y mesurer la concentration des polluants (166–169). Les cheveux sont utilisés depuis de nombreuses années en toxicologie médico-légale et clinique pour

évaluer la consommation passée de substances stupéfiantes ou de médicaments (167,170). En effet, après leur absorption dans l'organisme, les molécules exogènes sont incorporées dans le cheveu par diffusion depuis les capillaires sanguins entourant le follicule capillaire. Il est alors possible d'y mesurer leurs concentrations jusqu'à plusieurs mois après l'exposition, tant que les cheveux n'ont pas été coupés (168,170). L'intérêt pour le cheveu en toxicologie environnementale est plus récent. Au cours de ces deux dernières décennies, différentes substances ont été mesurées dans les cheveux parmi lesquelles, des PCB, des PFAS, des bisphénols, des pesticides, etc. L'hypothèse supportant cette méthode est que les polluants environnementaux, tout comme les médicaments ou les produits stupéfiants, sont incorporés dans la racine du cheveu depuis la circulation sanguine. L'exposition aux polluants environnementaux étant quasi continue, le cheveu offrirait un effet mémoire permettant de retracer la contamination interne passée en fonction de sa longueur. Avec une croissance moyenne d'un centimètre par mois, le cheveu permettrait d'estimer l'exposition sur plusieurs mois, voire plusieurs années, bien qu'en pratique, la mesure de l'exposition sur de très longues périodes nécessiterait des longueurs de cheveux exceptionnelles. De plus, la récolte de cheveux est une technique non invasive qui ne nécessite pas la présence d'une équipe médicale pour le prélèvement. Un autre avantage est que les échantillons capillaires ne doivent en général pas être conservés dans des conditions critiques (167). Cependant, l'utilisation du cheveu en toxicologie environnementale se heurte à certaines difficultés. Si en toxicologie clinique ou médico-légale, la contamination externe est peu probable du fait de l'absence des produits recherchés dans l'environnement général, lors de la mesure de polluants environnementaux la contamination externe représente une source potentielle de biais car les molécules présentes dans l'air, les poussières, ou encore les différents produits appliqués sur le cheveu, pourraient pénétrer au cœur de la matrice (168,171). La concentration dans le cheveu ne serait alors pas parfaitement la représentation de l'exposition interne.

En préambule de notre travail sur le diabète, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de cette matrice alternative pour la mesure des polluants environnementaux non persistants afin de répondre à la question du type de prélèvement à utiliser.

3.1 Mise au point d'une méthode analytique pour la mesure de polluants persistants et non persistants dans le cheveu

Le laboratoire ne disposant pas de méthode d'analyse de différentes familles de polluants dans les cheveux, nous avons optimisé, validé et appliqué une méthode d'analyse de deux bisphénols, trois parabènes et huit PFAS dans les cheveux en utilisant les technologies les plus appropriées. Ensuite, nous avons mesuré pour la première fois les concentrations de ces polluants dans les cheveux d'une population Wallonne.

La méthode d'analyse développée est basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et est applicable à un grand nombre d'échantillons. Les échantillons capillaires sont prélevés à l'arrière du crâne, dans la zone occipitale, au plus près de la peau. Afin de limiter au maximum l'impact de la contamination externe, les échantillons sont ensuite lavés successivement dans un bain de sodium dodécyl sulfate (un tensioactif) et deux bains d'eau.

L'extraction se fait par incubation des cheveux dans différents milieux. En résumé, les échantillons sont incubés pendant 12 heures à 38 °C dans un mélange de méthanol et d'acide acétique. Cette incubation en milieu acide doit permettre l'extraction des composés hors de la matrice. Après cette étape, de l'acétone est ajoutée au mélange et les échantillons sont passés dans bain à ultrasons pour 15 minutes. Le surnageant est ensuite récupéré et évaporé sous azote. L'extrait est alors dilué dans un mélange d'acétate d'ammonium et de méthanol avant analyse en chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle.

La méthode a été rigoureusement validée selon l'approche de l'erreur totale de façon à atteindre les exigences de la norme ISO 17025 en suivant les directives de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (172). Les valeurs des limites de quantification (LOQ) basse et haute ont été fixées en accord avec les données de la littérature (173). Elles tiennent compte des différents niveaux de contamination attendus pour les polluants dans les cheveux, qui varient pour chaque molécule en fonction notamment des voies d'exposition propres à chaque composé (alimentaire pour les bisphénols et les PFAS, dermique pour les parabènes), ainsi (pour la LOQ) que d'un éventuel bruit de fond observé lors de la mise au point de la méthode analytique.

Après la validation, nous avons appliqué cette méthode à un panel de 114 individus vivant en région liégeoise sans exposition particulière. Les objectifs de cette étude étaient multiples : premièrement, vérifier la faisabilité de l'application de la méthode à un grand nombre d'individus. Le second objectif était d'établir des « valeurs de référence » pour la matrice cheveu dans notre population car il n'en n'existe alors pas en Wallonie. De plus, les participants ayant répondu à plusieurs questions concernant certains paramètres personnels (âge, sexe, ...) et sur l'utilisation de traitements capillaires, cette étude nous a permis d'évaluer l'impact de ces paramètres sur la contamination capillaire de notre population.

Les détails de l'optimisation de la méthode ainsi que les résultats de cette étude sur le cheveu sur une population liégeoise sont disponibles dans la publication 2.

Deuxième publication

Determination of contamination levels for multiple endocrine disruptors in hair from a non-occupationally exposed population living in Liege (Belgium)

Julien Claessens, Catherine Pirard, Corinne Charlier

Science of the Total Environment **815**, 152734 (2022)



Determination of contamination levels for multiple endocrine disruptors in hair from a non-occupationally exposed population living in Liege (Belgium)

Julien Claessens^{a,b,*}, Catherine Pirard^{a,b}, Corinne Charlier^{a,b}

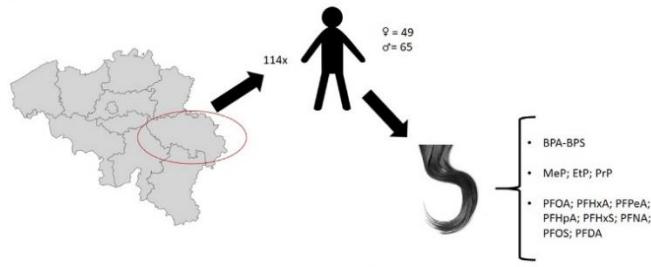
^a Laboratory of Clinical, Forensic, Industrial and Environmental Toxicology, University Hospital of Liege, CHU (B35), 4000, Liege, Belgium

^b Center for Interdisciplinary Research on Medicines (C.I.R.M), University of Liege, CHU (B35), 4000, Liege, Belgium

HIGHLIGHTS

- 2 bisphenols, 3 parabens and 8 PFCs were measured in the hair from 114 volunteers.
- MeP, BPS, BPA, PrP, ETP and PFOA were quantified in minimum 46.4 of samples.
- Levels were not statistically correlated with gender, hair length or treatment.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2021

Received in revised form 29 November 2021

Accepted 23 December 2021

Available online 30 December 2021

Editor: Adrian Covaci

Keywords:

Endocrine disrupting chemicals

Hair biomonitoring

Parabens

Bisphenols

Perfluororalkyl compounds

ABSTRACT

Today, the interest in hair as alternative matrix for human biomonitoring of environmental pollutants has increased, but available data on chemical levels in hair remain scarce. In this study, the measurement of 2 bisphenols (A and S), 3 parabens (methyl-, ethyl- and propylparabens) and 8 perfluororalkyl compounds (PFCs) namely perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanesulfonate (PFHxS), perfluoroctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluorooctanoic acid (PFHpA), perfluoropentanoic acid (PFPeA) and perfluorohexanoic acid (PFHxA) was carried out, using a thoroughly validated UPLC-MS/MS method, in the hair from 114 adults living in Liege (Belgium) and surrounding areas. The most frequently quantified compounds in the population were: bisphenol S (97.4%, median = 31.9 pg mg⁻¹), methylparaben (94.7%, median = 28.9 pg mg⁻¹), bisphenol A (93.9%, median = 46.6 pg mg⁻¹), ethylparaben (66.7%, median = 5.2 pg mg⁻¹), propylparaben (54.8%, median = 16.4 pg mg⁻¹) and PFOA (46.4%, median < 0.2 pg mg⁻¹). The other PFCs were detected only in few samples although current exposure of the Belgian population to PFCs was previously demonstrated using blood analyses. Nonparametric statistical analyses were performed to evaluate the influence of gender, hair treatments and hair length, but no significant difference was observed. Only age was positively correlated with the propylparaben contamination. Although blood seems to remain more suitable for PFCs exposure assessment, the results of this study suggest that hair can be an appropriate matrix for biomonitoring of organic pollutants such as parabens or bisphenols.

1. Introduction

Since the last decades, humans have been exposed to a growing number of chemical substances present in the industrial and domestic environment.

Some of these chemicals are reported to disrupt hormonal systems of living organisms. Nowadays, more than 800 man-made chemicals are known or suspected to act as endocrine disrupting chemicals (EDC) including a wide variety of products such as pesticides, plasticizers, product additives,

* Corresponding author at: University of Liege, CHU (B35), avenue de l'Hôpital, 1, 4000, Liege, Belgium.
E-mail address: julien.claessens@uliege.be (J. Claessens).

personal care product ingredients, pharmaceuticals, etc. (Bergman et al., 2012; Gore et al., 2015).

These last fifty years, perfluororalkyl compounds (PFCs) have been widely used in different types of products, for industrial and domestic uses. The chemical structure of PFCs confers them particular properties including water and oil repellence, thermal stability, and surfactant properties (Gomis et al., 2018; Ritscher et al., 2018). Since the early 2000's PFCs have become a great cause of concern in term of toxicity and health as they are largely distributed in the environment. Significant concentrations of PFCs have been found in human serum ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) demonstrating the wide human exposure (Bartolomé et al., 2017; CDC, 2019; Coakley et al., 2018; Colles et al., 2020; Ledda et al., 2018; Norén et al., 2021; Pirard et al., 2020; Polachova et al., 2021). Number of toxic effects (altered hepatic function, influence on body weight, ...) have been input to PFCs (Lindstrom et al., 2011). They are categorized as persistent organic pollutants (POPs) and are under regulations in several countries. In Europe perfluorooctanoic acid (PFOA) production is banned since 2020 and European Food Safety Authority (EFSA) sets the tolerable weekly intake rates at 13 and 6 ng/kg body weight for perfluorooctanesulfonate (PFOS) and PFOA respectively (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2018; EU, 2016a; Knutson et al., 2018). Food intakes is the principal route of exposure to PFCs although human are also exposed by inhalation or ingestion of house dusts (Pirard et al., 2020).

Bisphenol A (BPA) is principally used for its plasticizing properties and is present in polycarbonate food containers, epoxy resins which coat conserve cans, dental implants and other plastic devices such as toys or compact discs (Ma et al., 2019; Ye et al., 2015). Humans are mainly exposed to BPA by ingestion of contaminated food but also by inhalation of house dusts and by dermal contamination (Ma et al., 2019; Rochester, 2013). BPA is an estrogenic compound (Vandenberg et al., 2014; Viñas et al., 2012) and its reported health effects are various and targeted different endocrine systems (Andújar et al., 2019; Heindel et al., 2020; Liu et al., 2021; Ma et al., 2019; Rochester, 2013). Because of wide exposure and associated health effects, BPA is now submitted to different regulations. BPA is banned from the composition of feeding bottle or drinking cup intended for infant and since 2011, has been phased out from thermal paper. In other devices, authorization of BPA is subject to the specific migration limit of 0.6 mg of BPA per kg of food (EU, 2011, 2016b, 2018).

Due to these regulations, in some applications, industrials tend to replace BPA by its sulfonyl analogue: bisphenol S (BPS) (Banaderakhshan et al., 2022; Moon, 2019). BPS is largely present in the environment and people are exposed on a daily basis although safety profile of BPS hasn't been fully assessed yet (Eladak et al., 2015; Wang et al., 2019; Wu et al., 2018). First toxicological studies on BPS effects seem to suggest similar-to-worth harmful health impacts than those observed for BPA (Debost-Legrand et al., 2016; Rochester and Bolden, 2015; Rosenmai et al., 2014; Žalmanová et al., 2016). BPS is reported to disrupt endocrine systems, to promote oxidative stress and obesity. Exposure to BPS may thus be potentially harmful for health (Eladak et al., 2015; Wu et al., 2018).

Parabens are frequently used chemicals especially for their antimicrobial conservative properties and are largely present in cosmetics and personal care products. Parabens are also found in food or medical drugs (Cherian et al., 2020; Karpuzoglu et al., 2013). The main exposure route is through dermal application of parabens-containing products, but inhalation and ingestion are other possible routes of exposure (Hong et al., 2021; Wei et al., 2021). Parabens have been reported as weak endocrine disruptors with effects on estrogen signaling pathways and action on hormones (adipsine, leptin) or receptors involved in metabolic and energy balance suggesting the obesogenic potential of these compounds (Boberg et al., 2010; Darbre, 2017; Linche et al., 2021; Šramková et al., 2019). Parabens are restricted in cosmetic products at a concentrations of 0.4% for single use and of 0.8% as mixture (EU, 2014).

Today, human biomonitoring is generally performed using blood or urine. Due to its contact with the whole organism, blood is generally considered as the reference matrix and to reflect cumulative exposure especially

for persistent pollutants such as PFCs (Alves et al., 2014; WHO, 2015). On the other hand, urine is largely used for the biomonitoring of rapidly eliminated substances such as bisphenols or parabens because of the higher concentration of the compound or its metabolites and the easiness of collection (Alves et al., 2014; WHO, 2015). Besides these two main matrices, over the last ten years, hair has gained attention as a novel matrix for biomonitoring of organic pollutants (Appenzeller, 2015). Hair offers many advantages such as the easiness of sample collection, the stability of sample storage and an extended detection window from month to years depending on hair length (Appenzeller and Tsatsakis, 2012; Schramm, 2008). This latter property is particularly interesting for the biomonitoring of rapidly eliminated substances such as bisphenols and parabens for which conventional biological fluids only provide information on recent exposure and are subject to a high temporal variability (Dewalque et al., 2014; Fäys et al., 2020; LaKind et al., 2019). Indeed hair has been reported to be less sensible to intra-individual temporal variability of non-persistent organic pollutants and suitable to assess their short or long term exposure (Béranger et al., 2018; Fäys et al., 2021).

Analyses of environmental pollutants in hair include a wide variety organic compounds among which polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, bisphenols, parabens or PFCs (Alves et al., 2015; Iglesias-González et al., 2020; Karzi et al., 2019, 2018; Katsikantami et al., 2020; Martín et al., 2019; Palazzi et al., 2018). Even though this last decade the number of studies on hair contamination has increased, some pollutants are still poorly studied in hair and number of regions of the world remain uncovered. Moreover, due to the frequent small-scale of the studies, few reference values have been established in general populations. Therefore, there is a need of performing biomonitoring studies in different regions and by different laboratories to enhance available data and allow the comparison of contamination levels between different populations and subpopulations.

The aims of this work were thus to provide data of contamination levels of 13 endocrine disrupting chemicals by measuring 8 PFCs, 2 bisphenols and 3 parabens in the hair of non-occupationally exposed adults living in Liege (Wallonia, Belgium), and to evaluate the suitability of using hair matrix for exposure assessment of these contaminants for further large-scale biomonitoring studies.

2. Materials and method

2.1. Chemicals and reagents

Solutions of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanesulfonate (PFHxS), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluoronanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluorooctanoic acid (PFHxA), perfluorooctanoic acid (PFPeA), perfluorooctanoic acid (PFHxA) and their corresponding C_{13} mass labelled isotopes were purchased from Wellington laboratories, Inc. (Ontario, Canada). Bisphenol S (BPS), ethylparaben (EtP) and n-propylparaben (PrP) were purchased from Sigma Aldrich® (St Louis, MO, USA). BPS- D_8 was bought from Chiron AS® (NO-7041, Trondheim, Norway) and Bisphenol A (BPA) and Bisphenol A- D_{14} were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Methylparaben (MeP) and $^{13}C_6$ -methylparaben were supplied by Cambridge Isotope Laboratories, while deuterated n-propylparaben (2,3,5,6-d₄) and ethylparaben (2,3,5,6-d₄) were obtained from C/D/N Isotopes Inc. (Quebec, Canada). Methylparaben standard, mass-labelled methyl-, ethyl-, propyl-parabens isotopes and all PFCs standards were obtained as solutions while other standards were purchased as crystalline powder.

Analytical grade acetone and acetic acid (HAc) were bought from Macron Fine Chemicals (Gliwice, Poland). LC-MS Grade methanol (MeOH) and water were bought from JT Baker (Deventer, The Netherlands), sodium dodecyl sulphate (SDS) (for analysis) was obtained from Sigma Aldrich (Germany) and Emsure grade ammonium acetate from Merck (Armstadt, Germany).

2.2. Volunteers and sample collection

Hair samples were collected between November 2020 and January 2021 from 114 volunteers aged from 17 to 64 years old and residing in Liege (Wallonia). The information collected from participants was gender, smoking habits, hair length and hair treatments. Samples (0.5–1 g) were cut at the occipital vertex and directly stored in paper envelope, in dark room at ambient temperature to avoid contamination and degradation until the analysis.

Prior to analysis, samples were washed using four different solvents according to Martín et al.'s (2016) procedure: firstly, with water, secondly by a SDS 0.1% bath and then two times again with water. At each step of the washing process, samples were sonicated for 5 min. After the washing procedure, samples were dried at room temperature and then cut into 2–3 mm pieces using stain steel scissors.

2.3. Extraction and analysis

The analytical procedure was strongly inspired from previously reported method by Martin and associates and adapted to our equipment (Martín et al., 2016). Briefly, 50 mg of each sample were weighted and put into glass extraction tubes. Ten μ L of the internal standard solution (5 μ g/mL for $^{13}\text{C}_6\text{-MeP}$, PrP-d₄, EtP-d₄, BPS-d₈, BPA-d₁₄ and 0.1 μ g/mL for ^{13}C -PFCs) were added and tubes were let at ambient temperature for equilibration for 1 h. Then, 2 mL of a methanol/HAc mixture (85/15% v/v) were added and samples were incubated at 38 °C overnight in static position to allow the release of compounds from the matrix. After the incubation, samples were sonicated for 15 min with 2 \times 2 mL of acetone, centrifuged for 10 min (at 3000 rpm), and the supernatants were transferred into clean tubes before being evaporated to dryness at 30 °C under nitrogen flow. Extracts were reconstituted with 100 μ L of ammonium acetate (2 mM) and methanol (70/30% v/v) mixture and transferred into vials for analysis.

The final determination was performed using an Acuity UPLC system coupled to a Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, US). The compounds were separated on an Acuity UPLC BEH C18 column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m) from Waters maintained at 50 °C, and using a constant flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. The mobile phase consisted of ammonium acetate 2 mM in water (A) and MeOH (B). The gradient started at 70% A held for 1 min, reached 60% A in 5 min, decreased to 20% in 10 min, then decreased again to 5% A in 0.2 min and held for 1.5 min. The return to the initial conditions (70% A) was reached in 0.2 min and maintained for 2.5 min.

The mass spectrometer operated in Multiple Reaction Monitoring (MRM), using negative electrospray ionization mode. The capillary voltage was set at 0.75 kV, the source and desolvation temperatures were set at respectively 150 °C and 450 °C, while nitrogen was used at a flow of 800 L/h as desolvation gas, at 150 L/h as cone gas, and under 7.0 bar for nebulizer gas. The precursor and daughter ions monitored, and the collision energy for each MRM transitions are gathered in Table S1 (Supplementary materials).

2.4. Method validation

The analytical procedure was validated according to the total error approach, in order to meet ISO 17025 and French Society of Pharmaceutical Sciences and Technique guidelines (Dubois et al., 2012; Hubert et al., 2007). The calibration curves and validation standards were respectively analyzed in duplicate and triplicate in a single day. Procedure was repeated on three different days to determine intra and inter-day precisions. The calibration curve consisted in reagent blank samples spiked at 8 different concentrations corresponding to respectively 10–25–50–100–500–1000–2000–4000 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPA, PrP, MeP and PFOS; 2–5–10–20–100–200–400–800 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPS and EtP; and 0.2–0.5–1–2–10–20–40–80 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for the other PFCs. The validation standards were prepared by spiking at 9 different concentrations (10–15–25–35–50–400–2000–3000–4000 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPA, PFOS, MeP, PrP; 2–3–5–7–10–80–400–600–800 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPS, EtP

and 0.2–0.3–0.5–0.7–1–8–40–60–80 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for other PFCs) dog hair as human hair substitute (because we didn't find human hair showing negligible levels for all targeted chemicals) previously checked for initial low contamination.

The validation parameters including limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were calculated with Enova Software v4.1 (Arlenda, Belgium), and are reported in Table 1. LOQ was defined as the smallest concentration with a maximal incertitude not exceeding 40% and LOD was calculated as one-third of LOQ. Further details on the determination of the LOQ and other validation parameters were already described (Dubois et al., 2012).

The matrix effect was tested using the post extraction addition method (Matuszewski et al., 2003) by comparing 4 points-calibration curves performed using reference solutions on one hand, and 6 different hair samples extracted as real samples on the other hand. For each compound, the variation coefficient of the slopes of the calibration curves did not exceed 6.6%, demonstrating that potential matrix effects if present are corrected by the use of isotope labelled internal standards, and thus are under control.

2.5. Quality assurance and control

Each sequence of unknown samples included a calibration curve (blank samples spiked at 8 concentrations), 1 reagent blank, and 5 home-made quality controls (3 blank samples spiked at 50, 100 and 1000 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPA, PrP, MeP and PFOS, at 10, 20 and 200 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPS and EtP, and at 1, 2 and 20 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for the other PFCs; and 2 dog hair samples spiked at 100 and 1000 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPA, PrP, MeP and PFOS, 20 and 200 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for BPS and EtP, and 2 and 20 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ for the other PFCs), all extracted and treated similarly than real samples.

2.6. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Rcmdr V4.0.3 and excel 2013 (Microsoft Office). Measured concentrations below LOQ were replaced by LOQ x detection frequency because this provides a more realistic mean missing value than LOQ/2, LOQ/ $\sqrt{2}$ or zero (Ali et al., 2013; Durti et al., 2010; Gys et al., 2020; James et al., 2002). The inference statistics were performed only for BPA, BPS, MeP, EtP, PrP and PFOA because of the low quantification frequencies observed for the other compounds. Since the distributions were highly skewed for all pollutants, nonparametric tests were used: Spearman rank was used to assess the correlations between concentrations and age (as continuous variable), and Mann-Whitney to test contamination differences between men and women. For the other multiple category variables as the influence of hair length or hair treatments, the associations with the pollutant concentrations were assessed using Kruskal-Wallis test. No statistic was performed on smoking status because of the low percentage of population reported as smokers (3%). Statistical relevance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study population

The studied population consisted in 114 volunteers living in the Liege Region, aged from 17 to 64 years old, and distributed between 43% males and 57% females. The participants were asked to report their hair length: 45% have short hair (0–7 cm), 21% medium hair (7–15 cm) and 34% long hair (>15 cm). Hair treatments were categorized in: none (75%), dyeing (7%) and discoloration (18%). The population characteristics by gender are gathered in Table 2.

3.2. Concentration of targeted compounds

The Table 3 presents the descriptive statistics: geometric mean (GM), percentile 25 (P25), 50 (P50), 75 (P75), minimum and maximum concentrations measured, the standard deviations (SD), the interquartile range

Table 1 Validation parameters including trueness bias (%), repeatability (RSD%), reproducibility (RSD%), uncertainty (%), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

	Target conc. pg mg ⁻¹	BPA	MeP	PfP	PfOS	BPS	Target conc. pg mg ⁻¹	EtP	Target conc. pg mg ⁻¹	PFoA	PFPeA	PFHxA	PFHxA	PFHxA	PFNA	PFDA
Trueness relative bias (%)																
10	-9.5	7.5	-11.7	42.3	2	4.4	22.7	0.2	2	-26.6	5.5	-6.2	0.5	-1.7	-17.4	
15	-2.5	0.6	-0.6	21.3	3	-7.3	13.9	0.3	-0.3	-15.4	-0.6	0.8	-0.2	1.9		
25	-0.3	3.6	-0.8	4.3	5	-3.5	12	0.5	-0.6	0.1	1.3	0.1	2.5	1.8	-0.6	
35	2.5	2.8	7.7	0.03	7	1.1	14.2	0.7	1.1	15.4	-0.5	2.4	1.8	-0.5		
50	-2.8	8.8	-1.3	10	-3.5	12.7	1	13.2	6.9	10.9	8.6	12.4	10	9.7		
80	-1.2	3.2	5.4	-8.8	80	-0.6	5.1	8	4.9	5.8	1.3	0.4	2.3	4.9	-0.1	
400	-11.3	-0.1	-6	-1.2	400	0.5	-7.4	40	-3.1	2.9	-2.9	-0.2	-3.2	-2.1	-6.4	
2000	-0.3	0.4	-4.4	-7.4	600	-6.6	-4.6	60	-8.1	-0.7	-1.4	0.02	-1.5	1.8	0.1	
4000	-7	1.1	-	11.6	800	-2	-1.6	80	2.8	3.6	1.9	3.3	1.9	5.1	-0.5	
Intra-assay precision repeatability (%)																
10	2.4	2.4	5.6	2	7	3.3	0.2	7.9	12.7	8.9	6.8	9.2	5.1	15.5		
15	5.8	1.4	7.6	1.3	3	6.2	4.3	0.3	6.3	9	9.1	2.5	2.8	5.6	11.1	
25	2.2	2.4	9.9	1	5	7.2	3.5	0.5	3.8	6.8	2.8	2.7	3.9	4.5	4.8	
35	3.1	1.6	5.4	3	7	5.1	5.7	0.7	2.1	3.7	2.6	2.3	3.8	3.7	5	
50	1.4	9	6.7	7	10	15.5	2.3	1	2.3	5.8	4.7	2.4	6.1	6.4	9.8	
80	1.7	2.2	2.1	6.5	80	2.1	1.6	8	4.8	3.1	2.7	2.6	1	2.2	3.4	
2000	2.6	1.7	2.1	4.8	400	2.6	2	40	2.7	3.8	3.3	3.8	2.1	2.6		
3000	0.7	1.7	2	7.7	600	3.1	4.9	60	3.8	3.2	3.1	1.9	2.9	3.2	6.1	
4000	2.4	1.3	-	4.4	800	1.3	2.2	80	1.9	0.7	1.7	2.1	3	1.7	3.4	
Inter-assay precision intermediate precision (r _d %)																
10	9.3	2.7	15	6.6	2	11.8	5.6	0.2	8.7	21.6	15.2	6.8	9.2	5.8	33.9	
15	8.2	16	10.6	3.8	3	6.2	10.4	0.3	6.3	13.5	8.1	2.5	2.8	6.2	11.5	
25	3.1	3.5	12.2	2.9	5	7.2	8.6	0.5	3.8	6.8	2.8	2.7	3.9	4.6	10.5	
35	5.1	9.5	3.7	9.5	3	7	5.1	9.7	0.7	2.1	5.6	3.3	3.8	3.9	6.3	
50	5.5	12.9	7.3	7.6	10	16.4	6.8	1	4.1	11.5	5.6	3.9	6.1	7.2	9.8	
80	8.3	6	6.7	6.7	80	2.1	6.3	8	5.1	7.2	6	2.6	1.5	6.4	3.5	
2000	3.8	2.6	3	4.8	400	4.2	2.3	40	4	4.8	4	4.2	4.2	4.2	4.8	
3000	3.5	1.7	4.9	9.6	600	9.4	6.3	60	4	3.2	3.9	3.1	3.6	3.1	6.5	
4000	8.5	1.8	-	8.1	800	3.1	6.7	80	2.2	1.8	3.2	2	1.9	4.6		
Uncertainty relative expanded uncertainty (%)																
10	2.4	5.9	31.7	14.3	2	26.4	12.5	0.2	19.1	48.4	34.1	14.4	19.3	12	77	
15	18.1	36.9	23.4	8.7	3	13.2	23.7	0.3	13.3	30.6	17.1	5.4	5.9	13	24	
25	6.9	7.8	18	6.7	5	15.3	19.5	0.5	8.1	14.4	5.9	5.8	8.2	9.6	23.9	
35	11.6	6.1	21.3	6.3	7	10.9	21.8	0.7	4.6	12.6	7.3	5	8	8.2	13.9	
50	12.7	28.6	15.6	16.2	10	35.1	15.6	1	9.4	26	12.2	8.7	12.8	15.5	20.7	
80	19.2	13.7	15.4	14.1	80	4.5	14.5	8	11	16.5	13.7	5.5	3.4	14.7	7.5	
2000	8.5	6	6.6	10.2	400	9.5	5.1	40	8.9	10.5	8.7	8.5	9.2	4.9	10.8	
3000	8.2	3.7	11.3	20.9	600	21.6	14.4	60	8.7	6.9	68.6	5	7.9	6.7	13.9	
4000	19.7	4	-	18.1	800	7.1	15.3	80	4.7	4.2	7.4	4.3	6.7	4.1	10.2	
LOD (pg mg ⁻¹) LLQ (pg mg ⁻¹) ULQ (pg mg ⁻¹) R ² Model																
3.03	10	10	3.03	3.03	2	0.61	0.61	0.2	0.317	0.2	0.2	0.061	0.061	0.061	0.082	
4000	4000	4000	3000	4000	800	800	800	80	80	80	80	80	80	80	0.271	
0.992	0.99	0.997	0.991	0.995	1	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.995	
Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	Weighted	
1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	1/X quad.	
1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	1/X Linear	
Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	Regression	

Bold character indicates target concentration for different compounds on the right of the column.

Table 2

Population characteristics by gender.

	Total N (%)	Men N (%)	Women N (%)
All Age	114 (100)	49 (43)	65 (57)
	Median P25-P75	26.5 22.3-40.8	26.0 23.3-33.8
Smoking status			
Smoker	3 (3)	1 (2)	2 (3)
Non-smoker	111 (97)	48 (98)	63 (97)
Hair length			
Short	51 (45)	48 (98)	3 (5)
Medium	24 (21)	1 (2)	23 (35)
Long	39 (34)	0 (0)	39 (60)
Hair treatment			
None	85 (75)	49 (100)	36 (56)
Dyeing	8 (7)	0 (0)	8 (12)
Discoloration	21 (18)	0 (0)	21 (32)

(IQR), and the detection and quantification frequencies for all target compounds. The most frequently detected chemical was MeP (100%), closely followed by BPS and BPA (99.1 and 97.4% respectively). The large majority of PFCs were detected and quantified only in few samples except for PFOA for which detection and quantification frequencies were 86.8 and 46.4% respectively. BPA and BPS were the compounds with the highest median concentration measured in the hair of our population (median: 46.6 and 31.9 pgmg^{-1} respectively). The measured median concentrations of parabens ranged between 5.2 and 28.9 pgmg^{-1} , methylparaben showing the highest concentrations. Very few samples exhibited particularly high contamination levels of methylparaben and ethylparaben (maximum levels of several tens of thousands pgmg^{-1}).

A comparison between concentrations measured in our subpopulation and those reported from other studies related to more than 30 volunteers is presented in Table 4 for PFCs and Table 5 for parabens and bisphenols.

3.3. Correlations and influence of gender, age and hair characteristics on contamination levels

Spearman's rank correlations between the contamination levels of the different pollutants are reported in Table 6. Significant correlations were observed between BPA and BPS ($p < 0.001, r = 0.55$), MeP and EtP ($p < 0.001, r = 0.36$), MeP and PrP ($p < 0.001, r = 0.61$), MeP and BPS

($p < 0.001, r = 0.26$), MeP and BPA ($p < 0.001, r = 0.38$), EtP and PrP ($p < 0.001, r = 0.37$), EtP and BPA ($p = 0.023, r = 0.21$), EtP and PFOA ($p = 0.021, r = 0.21$), PrP and BPS ($p = 0.038, r = 0.19$), PrP and BPA ($p < 0.001, p = 0.41$), PrP and PFOA ($p = 0.033$ and $r = 0.19$). Other correlations were highlighted between BPS and PFOA ($p < 0.001, r = 0.39$) and between BPA and PFOA ($p < 0.001, r = 0.40$). Weak but significant association with age was only highlighted for PrP in the whole studied population ($p = 0.044, r = 0.18$). This correlation was strengthened in women ($p = 0.038, r = 0.26$) but non-significant in men ($p = 0.774, r = 0.04$). Table 7 reports the median concentrations of parabens, bisphenols and PFOA according to gender, hair length or treatments. Higher levels were observed in the hair of women for all targets, but the differences were not statistically significant. No influence of hair length or treatments on the contamination burden was highlighted.

4. Discussion

In the present study, we measured the hair concentration of two bisphenols, three parabens and 8 PFCs. The concentrations and contamination tendencies observed in our population are discussed regarding the backdrop of literature in hair and other matrices.

In our study, the majority of PFCs were lowly detected except PFOA which was quantified in 46.5% of samples. These low quantification rates for the other PFCs could be explained by the LOQ ($10 \text{ pg}\text{mg}^{-1}$ for PFOS, between $0.2 \text{ pg}\text{mg}^{-1}$ and $0.32 \text{ pg}\text{mg}^{-1}$ for all other PFCs) higher than detectable concentrations in hair of our population. However, as shown in Table 4, these LOQs seem suitable with concentrations reported in the literature in the hair from Korean, Chinese or Greek populations (Kim et al., 2019; Liu et al., 2020; Martín et al., 2019). Lower concentrations were observed in China (Wang et al., 2018) or in Belgium (Alves et al., 2015). These differences in contamination levels could result from differences in contamination of the environment, from differences in alimentation and living habits or from differences in the analytical procedure. The very low detection rates observed were not expected since PFHxA, PFOA and PFOS were detected in 100% and PFNA, PFDA in respectively 99.6 and 85.6% of serum samples from a similar subpopulation living in Liege, demonstrating that human exposure to PFCs occurs in Wallonia (Pirard et al., 2020). This would argue that blood remains the most suitable matrix for the assessment of PFCs exposure.

In our study, no statistical difference in PFOA contamination was observed between men and women consistently with results reported in the hair of populations from South Korea and Spain (Kim et al., 2019; Martín et al., 2019). However these results are different from the ones obtained

Table 3

Summary of the pollutant concentrations measured in hair of our Belgian studied population: detection ($N > \text{LOD}$) and quantification ($N > \text{LOQ}$) frequencies (%), geometric mean (GM), standard deviations (SD), interquartile range (IQR), percentiles 25 (P25), 50 (P50), and 75 (P75), minimum and maximum concentrations measured in (pgmg^{-1}).

	N > LOD (%)	N > LOQ (%)	GM pgmg^{-1}	SD pgmg^{-1}	IQR pgmg^{-1}	Min pgmg^{-1}	P25 pgmg^{-1}	P50 pgmg^{-1}	P75 pgmg^{-1}	Max pgmg^{-1}
Bisphenols										
BPA	97.4	93.9	46.1	82.7	67.1	<LOQ	21.7	46.6	88.8	587.1
BPS	99.1	97.4	32.8	266.7	47.0	<LOQ	15.4	31.9	62.4	2298.0
Parabens										
MeP	100.0	94.7	104.2	8437.1	180.6	<LOQ	24.1	28.9	204.8	53,356.0
EtP	87.7	66.7	8.7	2740.8	15.3	<LOQ	5.2	16.7	26,967.7	
PrP	78.1	54.8	22.9	211.7	55.0	<LOQ	<LOQ	16.4	61.6	1517.1
Perfluroalkyl compounds (PFCs)										
PFPeA	6.1	<LOQ	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFHxA	18.4	5.3	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.4
PFHpA	4.4	1.8	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.4
PFOA	86.8	46.4	<LOQ	0.4	0.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.3	3.4
PFNA	43.9	19.3	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.7
PFDA	0.0	0.0	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFHxS	11.4	1.8	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	18.8
PFOS	0.9	0.9	<LOQ	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11.3

Table 4
comparison of PFCs contamination levels in hair observed in different studies (in pg mg^{-1}).

Reference	N	Country	Concentrations (pg mg^{-1})			PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFNA	PFDA	PFHxS	PFOS
			PFOA	Median	Range							
Current study (Martín et al., 2019)	114	Belgium	<LOQ	<LOQ-3.4	<LOQ	<LOQ	<LOQ-2.4	<LOQ	<LOQ-1.4	<LOQ	<LOQ	<LOQ-11.3
(Alves et al., 2015)	42	Spain	1.4	0.1-9.5	6.8	4.6-13.3	8.9	2.0-10.6	2.4	0.6-10.1	—	—
(Liu et al., 2020)	30	Belgium	—	0.02-0.07	—	0.07-0.09	—	0.03-0.07	<LOQ	<LOQ	—	0.7-11
(Ruan et al., 2019)	49	China	—	<0.44-1.8	—	<0.41-1.3	—	<0.39-1.5	<0.22-1.2	<LOD	<LOQ	<LOQ-49
(Kim et al., 2019)	39	India	0.09	—	—	—	—	—	<LOQ-1.0	0.33	<LOQ-2.2	0.18
	94	Korea	1.4	<LOQ-6.8	0.42	<LOQ-2.3	0.51	<LOQ-3.9	<LOQ	<LOQ-1.0	0.33	<LOQ-6.5
									<LOQ-2.2	0.18	<LOQ-0.8	0.22
									<LOQ-0.8	0.22	<LOQ-0.8	0.78
									<LOQ-0.78			

from serum analysis usually showing statistically higher contamination levels in men than in women (Colles et al., 2020; Pirard et al., 2020).

Biomonitoring data on BPS in hair are scarce, to the best of our knowledge only two other studies quantified BPS in the hair of more than 30 volunteers. As observed in Table 5, our results are consistent with those reported in Crete and in both populations from China and France included in the same study (Katsikantami et al., 2020; Peng et al., 2020). Because both studies were focused on a female population it isn't possible to compare the absence of significant difference between the concentration levels observed in men and women hair. In urine, non-significant differences were reported between genders from 8 different countries (Liao et al., 2012) similarly to what was reported by Lehmler et al. (2018) for some American adults and children. In the present study, BPS concentration was correlated with BPA which could be explained by the simultaneous presence of both compounds in the same kind of products such as polycarbonate plastics or epoxy resins (Lehmler et al., 2018). This correlation was not always observed in studies focused on BPA and BPS in hair (Katsikantami et al., 2020).

Although a limited number of studies have focused on biomonitoring of BPS in hair, more data are available in the literature concerning BPA (Table 5). No difference between genders was observed for BPA contamination, similarly to what was observed in the hair of two other adult (Martín et al., 2019; Nehring et al., 2017) and children populations (Karzi et al., 2018). It should be noted that results on gender differences concerning BPA contamination levels in urine are contradictory in the literature, as no gender difference was observed in the urine of a Belgian population (Pirard et al., 2012), whereas significant difference was observed in the US population where BPA levels were higher in women than in men (Calafat et al., 2008). The inverse difference was observed more recently (Lehmler et al., 2018).

Among the compounds largely detected, parabens were quantified in at least 54.8% of hair samples. The measured concentrations in hair are in the same range than those already published and gathered in Table 5 (Karzi et al., 2019; Martín et al., 2019). As already reported by Martin & al. (2019), higher median concentrations for all parabens were observed in the hair of women, although not significantly. This higher contamination for Belgian women was also previously observed in urine (Dewalque et al., 2014). PrP hair concentration was positively associated with age, especially in women group. This trend has already been observed in the urine from Korean population (Kang et al., 2016). This correlation may be explained by the fact that women and especially older ones are more susceptible to use personal care products which are one of the main sources of exposure to parabens. (Calafat et al., 2010). As expected, correlations were highlighted between all parabens (Table 6), known to be used in association in pharmaceutical preparations, foods, cosmetics and personal care products (Andersen, 2006; Janjua et al., 2008).

All paraben levels were also positively but weakly correlated with bisphenol contamination. PFOA concentration was positively associated with BPA, BPS, PrP and EtP. This trends would likely be explained by confounding factors affecting exposure which weren't identified in the present work.

In this study, no difference was observed according to hair treatments although hair dyeing has been demonstrated to affect the hair structure and consequently the affinity of the chemical for the matrix (Appenzeller and Tsatsakis, 2012; Schramm, 2008). Indeed hair coloring or discoloring processes generally involved oxidation with oxygen peroxide which can alter the structural integrity of hair (Covaci et al., 2002) and interfere with the incorporation of chemicals in the matrix (Gerace et al., 2017). Some studies suggested that dyeing could enhance absorption of lowly hydrophobic parabens (MeP > EtP > PrP) (Sako et al., 2015), while others reported higher concentrations in dyed hair for MeP and PrP (Martín et al., 2019). In this study no difference in concentration levels was observed according to the hair length. On the contrary, some authors assumed that hair length might affect the deposition and absorption patterns of environmental pollutants, shorter hair is, higher the frequency of cutting hair is and thus lower is the time to the hydrophobic pollutants to be incorporated in

Table 5
 comparison of parabens and bisphenol contamination levels in hair observed in different studies (in $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Reference	N	Country	Concentrations ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)											
			BPA		BPS		MeP		EtP		PrP			
			Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range
Current study	114	Belgium	46.6	<LOQ-587.1	31.9	<LOQ-2298.0	28.9	<LOQ-51307	5.2	<LOQ-26967.7	16.4	<LOQ-1517.1		
(Martín et al., 2019)	42	Spain	24.4-1427	—	—	—	—	68.3-14.187	2.9-6565	—	—	12.5-9009		
(Karzi et al., 2019)	95	Greece	—	—	—	—	1437.1	17.6-27.4	167.3	11-4224.5	—	—		
(Katsikantam et al., 2020)	100	Greece	69.9	9.6-650.3	3.5	0.8-147.3	—	—	—	—	—	—		
(Peng et al., 2020)	204	China	34.9	5.47-596	2.84	0.5-817	—	—	—	—	—	—		
(Nehring et al., 2017)	311	France	118	17.1-1398	8.32	0.07-1246	—	—	—	—	—	—		
	42	Poland	337.5	26.1-1498.6	—	—	—	—	—	—	—	—		

Table 6
 Spearman's rank correlations (p -value) between levels of pollutants in hair.

	MeP	EtP	PrP	BPS	BPA	PFOA
MeP	—					
EtP	0.36 (<0.001)	—				
PrP	0.61 (<0.001)	0.37 (<0.001)	—			
BPS	0.26 (<0.001)	0.16 (0.077)	0.19 (0.038)	—		
BPA	0.38 (<0.001)	0.21 (0.023)	0.41 (<0.001)	0.55 (<0.001)	—	
PFOA	0.15 (0.109)	0.21 (0.021)	0.19 (0.033)	0.39 (<0.001)	0.40 (<0.001)	—

the matrix (Ruan et al., 2019). However, this reduction of observed contamination could also be attributed to a reduction of the external deposition rather than incorporation. The influence of hair characteristics or cosmetic treatments remains unknown for number of chemicals and further studies are needed to take these parameters into account.

Some samples were highly contaminated by parabens, by 3 orders of magnitude higher than the present upper LOQ, and 5 times higher than median concentration of samples. After investigations, it appeared that all the

volunteers showing these outliers reported using hair wax or hair gels containing parabens. This suggests that gel or wax applied on hair could represent a bias for hair biomonitoring of compounds entering in the composition of such products. Very high concentration values for these compounds would likely indicate that the washing steps did not fully remove this kind of external contamination (gel or wax use to be quite sticky or greasy). On another hand, using such products could also increase the individual exposure by skin contact for instance, which will result in higher individual contamination level. This latter hypothesis could be confirmed by analyzing the contamination markers in other matrix such as urine or blood. Today external contamination remains a highly controversial issue in hair analysis and there is no consensus on hair decontamination procedure removing entirely but exclusively the external contamination (Appenzeller, 2015; Kucharska et al., 2015). External decontaminations are generally performed using water and/or water with shampoo (Appenzeller and Tsatsakis, 2012; Duca et al., 2014), or using organic solvents like methanol or acetone (Duca et al., 2014) but these latter need to be used carefully to avoid removing internal incorporation of pollutants (Kucharska et al., 2015). The use new original techniques to distinguish external contamination and incorporation from blood in hair structure would likely help to develop more efficient decontamination procedures remaining safe for the sample integrity (Erne et al., 2019).

Table 7
 Median concentrations of parabens, bisphenols and PFOA according to gender, hair length or treatment (in $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$).

NN	MeP			EtP			PrP			
	P50 ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Range ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	p-value	P50 ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Range ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	p-value	P50 ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Range ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	p-value	
Gender										
Women	65	64.9	<LOQ-53356.0	0.213	6.4	<LOQ-26967.7	65.0	<LOQ-1147.5	0.287	
Men	49	44.4	<LOQ-51370.0	—	3.9	<LOQ-11847.7	52.6	<LOQ-1517.1	—	
Hair length										
Short	51	55.5	<LOQ-51370.0	0.741	4.7	<LOQ-11847.6	13.7	<LOQ-1517.1	0.596	
Medium	23	56.2	<LOQ-15447.2	—	2.3	<LOQ-26967.7	31.8	<LOQ-1100.4	—	
Long	43	62.9	14.2-53,356.0	—	5.8	<LOQ-2061.3	15.9	<LOQ-1147.5	—	
Hair treatment										
None	77	48.1	<LOQ-53356.0	0.447	4.7	<LOQ-26967.7	15.9	<LOQ-1517.1	0.429	
Discoloration	7	97.4	17.33-845	—	8.1	<LOQ-82.4	19.2	<LOQ-164.9	—	
Dyeing	16	44.9	14.8-5139.3	—	5.1	<LOQ-2061.3	27.1	<LOQ-1147.5	—	
NN										
BPS			BPA			PFOA				
NN			P50 ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Range ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	p-value	P50 ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Range ($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	p-value		
Gender										0.242
Women	65	37.1	<LOQ-2298.0	0.141	54.3	<LOQ-587.1	<LOQ	<LOQ-1.6		
Men	49	26.4	<LOQ-1416.8	—	35.4	<LOQ-292.8	0.2	<LOQ-3.4		
Hair length										0.359
Short	51	26.9	<LOQ-1416.8	0.318	35.9	<LOQ-287.1	0.2	<LOQ-3.4		
Medium	23	40.3	12.04-395.8	—	63.3	<LOQ-587.1	<LOQ	<LOQ-0.6		
Long	43	31.8	<LOQ-2298.0	—	47.0	<LOQ-299.2	<LOQ	<LOQ-1.6		
Hair treatment										0.687
None	77	30.8	<LOQ-2298.0	0.159	41.5	<LOQ-299.2	<LOQ	<LOQ-3.4		
Discoloration	7	15.8	3.0-122.4	—	35.5	<LOQ-213.2	<LOQ	<LOQ-1.4		
Dyeing	16	51.9	<LOQ-395.8	—	59.4	<LOQ-587.7	<LOQ	<LOQ-1.6		

The present study suffers from several limitations. Firstly, the small-scale sized population recruited is not representative of the Belgian population in terms of geographical area, socio-economic status, nor age. Secondly, the used external decontamination process didn't seem to be efficient enough to remove wax or gel when applied on the hair. The lack of washing standardization but also as the lack of hair reference materials (commercial quality control, blank matrix) for environmental pollutant analysis could lead to a variability between lab's results and thus could explain at least partially the differences in hair contamination levels reported in different studies.

Finally, the absence of significant difference between males and females in the present study and more generally all statistical results, should be considered in the view of the limited number of subjects included in this study, which probably doesn't allow to reach high statistical power. Moreover, the wide range of concentration is probably a confounding factor which could hide the real influence of tested parameters.

5. Conclusion

This manuscript presents the first study of contamination levels of three parabens, two bisphenols and 8 PFCs using hair as matrix from a subpopulation living in the city of Liege (Wallonia, Belgium). Our results demonstrate that the hair samples of the 114 individuals were widely contaminated by bisphenols, parabens and PFOA. On the other hand, other PFCs were lowly detected. No significant difference in hair contamination was observed according to the gender, hair length or hair treatment. However, the statistical power of our study needs to be interpreted considering the limited number of subjects included in this study.

Although our population was not representative and large enough to produce reference values as strictly speaking or to represent trends of a general population, the present study provides additional concentration values in hair of a sub-group of a non-occupationally exposed population and thus grows the available data on hair contamination levels for the target chemicals. If today blood seems to remain the most suitable matrix for PFCs exposure assessment, hair would be a promising approach for future exposure assessments of environmental pollutants such like bisphenols or parabens. Nevertheless, further studies are still needed to enlarge the number of chemical substances measurable in hair, characterize different populations by pollutants hair levels, and define standardized procedure for external decontamination steps.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152734>.

Funding

This research didn't receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Julien Claessens: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – original draft, Investigation. **Catherine Pirard:** Methodology, Writing – review & editing, Conceptualization. **Corinne Charlier:** Supervision, Project administration, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2018. Toxicological Profile for Per- And Polyfluoroalkyl Substances: Draft for Public Comment. 852.
- Ali, N., Eqani, S.A.M.A.S., Malik, R.N., Neels, H., Covaci, A., 2013. Organohalogenated contaminants (OHCs) in human serum of mothers and children from Pakistan with urban and rural residential settings. *Sci. Total Environ.* 461–462, 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.044>.
- Alves, A., Kucharska, A., Erratico, C., Xu, F., Den Hond, E., Koppen, G., Vanermen, G., Covaci, A., Voorspoels, S., 2014. Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4063–4088. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7748-1>.
- Alves, A., Jacobs, G., Vanermen, G., Covaci, A., Voorspoels, S., 2015. New approach for assessing human perfluoroalkyl exposure via hair. *Talanta* 144, 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.009>.
- Andersen, A., 2006. Final amended report on the safety assessment of oxyquinoline and oxyquinoline sulfate as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/10915810600716570>.
- Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, I., Álvarez-Cubero, M.J., Aguilera, M., Montecagudo, C., Rivas, A., 2019. Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: a review. *Nutrients* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu11092136>.
- Appenzeller, B.M.R., 2015. Hair analysis for the biomonitoring of human exposure to organic pollutants. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801700-5.00007-8>.
- Appenzeller, B.M.R., Tsatsakis, A.M., 2012. Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: state of the art, critical review and future needs. *Toxicol. Lett.* 210, 119–140. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.10.021>.
- Banaderakhan, R., Kemp, P., Breul, L., Steinbichl, P., Hartmann, C., Fürhacker, M., 2022. Bisphenol A and its alternatives in Austrian thermal paper receipts, and the migration from reusable plastic drinking bottles into water and artificial saliva using UHPLC-MS/MS. *Chemosphere* 286, 131842. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131842>.
- Bartolomé, M., Gallego-Picó, A., Cutanda, F., Huertos, O., Esteban, M., Pérez-Gómez, B., Castaño, M., 2017. Perfluorinated alkyl substances in Spanish adults: geographical distribution and determinants of exposure. *Sci. Total Environ.* 603–604, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.031>.
- Béranger, R., Hardy, E.M., Dexet, C., Guldner, L., Zaros, C., Nougadère, A., Metten, M.A., Chevrier, C., Appenzeller, B.M.R., 2018. Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: results from the ELFE national birth cohort. *Environ. Int.* 120, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.023>.
- Bergman, Å., Helindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals. *2012. Toxicol. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.020>.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass, U., 2010. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod. Toxicol.* 30, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.03.011>.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 39–44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Bishop, A.M., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005–2006. *Environ. Health Perspect.* 118, 679–685. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901560>.
- CDC, 2019. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. *Cent. Dis. Control Prev. 1. CDC*, pp. 1–529.
- Cherian, P., Zhu, J., Bergfeld, W.F., Belisito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Heldreth, B., 2020. Amended safety assessment of parabens as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 39, 5S–97S. <https://doi.org/10.1177/1091581820925001>.
- Coakley, J., Bridgen, P., Mueller, J., Douwes, J., 't Mannetje, A., 2018. Polybrominated diphenyl ethers and perfluorinated alkyl substances in blood serum of New Zealand adults, 2011–2013. *Chemosphere* 208, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.191>.
- Colles, A., Bruckers, L., Den Hond, E., Govarts, E., Morrens, B., Schettgen, T., Buekers, J., Coertjens, D., Nawrot, T., Loots, I., Nelen, V., De Henauw, S., Schoeters, G., Baeyens, W., van Lareborte, N., 2020. Perfluorinated substances in the Flemish population (Belgium): levels and determinants of variability in exposure. *Chemosphere* 242, 125250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125250>.
- Covaci, A., Tutudaki, M., Tsatsakis, A.M., Schepens, P., 2002. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants. *Chemosphere* 46, 413–418. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00065-0).
- Darbre, P.D., 2017. Endocrine disruptors and obesity. *Curr. Obes. Rep.* 6, 18–27. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0240-4>.
- Debast-Legrand, A., Warembourg, C., Massart, C., Chevrier, C., Bonvallot, N., Monfort, C., Rouget, F., Bonnet, F., Corder, S., 2016. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.005>.
- Dewalque, L., Pirard, C., Charlier, C., 2014. Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a belgian population. *Biomed. Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/649314>.
- Dirtu, A.C., Jaspers, V.L.B., Cenat, R., Neels, H., Covaci, A., 2010. Distribution of PCBs, their hydroxylated metabolites, and other phenolic contaminants in human serum from two european countries. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2876–2883. <https://doi.org/10.1021/es902149b>.
- Dubois, N., Pacou, A.P., De Backer, B.G., Charlier, C.J., 2012. Validation of the quantitative determination of tetrahydrocannabinol and its two major metabolites in plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to the total error approach. *J. Anal. Toxicol.* 36, 25–29. <https://doi.org/10.1093/jat/blr009>.
- Duca, R.C., Hardy, E., Salquébère, G., Appenzeller, B.M.R., 2014. Hair decontamination procedure prior to multi-class pesticide analysis. *Drug Test. Anal.* 6, 55–66. <https://doi.org/10.1002/dta.1649>.
- Eladak, S., Grisín, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2015. A new chapter in the bisphenol A

- story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005>.
- Eme, R., Bernard, L., Steuer, A.E., Baumgartner, M.R., Kraemer, T., 2019. Hair analysis: contamination versus incorporation from the circulatory system—investigations on single hair samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 91, 4132–4139. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05866>.
- EU, 2011. EU, 2011. Commission implementing regulation (EU) no. 321/2011 of 1 April 2011 amending regulation (EU) no. 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. *Off. J. Eur. Union L87, 1–2 Off. J. Eur. Union 3–4.*
- EU, 2014. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union L 282, 1–13.*
- EU, 2016b. Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A. *Off. J. Eur. Union 2001, 20–30.*
- EU, 2016,2017a. Commission regulation (EU) 2017/1000 of 13 June 2017 amending Annex XVII to regulation (EC) no. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related substances. *Off. J. Eur. Union 2016, 5–6.* <https://doi.org/10.1016/j.jfso.2016.03.026>.
- EU, 2018. Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials. *Off. J. Eur. Union 2016, 20–30.*
- Fäys, F., Palazzi, P., Hardy, E.M., Schaeffer, C., Phillipat, C., Zeimet, E., Vaillant, M., Beausoleil, C., Rouselle, C., Slama, R., Appenzeller, B.M.R., 2020. Is there an optimal sampling time and number of samples for assessing exposure to fast elimination endocrine disruptors with urinary biomarkers? *Sci. Total Environ.* 747, 141185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141185>.
- Fäys, F., Hardy, E.M., Palazzi, P., Haan, S., Beausoleil, C., Appenzeller, B.M.R., 2021. Biomonitoring of fast-elimination endocrine disruptors – results from a 6-month follow up on human volunteers with repeated urine and hair collection. *Sci. Total Environ.* 778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146330>.
- Gerae, E., Veronesi, A., Martra, G., Salomone, A., Vincenti, M., 2017. Study of cocaine incorporation in hair damaged by cosmetic treatments. *ForensicChem. 3, 69–73.* <https://doi.org/10.1016/j.jfore.2017.02.004>.
- Gomis, M.I., Vestergren, R., Borg, D., Cousins, I.T., 2018. Comparing the toxic potency in vivo of long-chain perfluoroalkyl acids and fluorinated alternatives. *Environ. Int.* 113, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.011>.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 36, 1–150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Gys, C., Al-Baamai, Y., Araki, A., Bastiaensen, M., Caballero-Casero, N., Kishi, R., Covaci, A., 2020. Biomonitoring and temporal trends of bisphenols exposure in Japanese school children. *Environ. Res.* 191, 110172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110172>.
- Heindel, J.J., Belcher, S., Flaws, J.A., Prins, G.S., Ho, S.M., Mao, J., Patiño, H.B., Ricke, W., Rosenfeld, C.S., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Zoeller, R.T., 2020. Data integration analysis, and interpretation of eight academic CLARITY-BPA studies. *Reprod. Toxicol.* 98, 29–60. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.05.014>.
- Hong, S., Jeon, H.L., Lee, J., Kim, S., Lee, C., Lee, S., Cho, Y.H., Choi, K., Yoo, J., 2021. Urinary parabens and their potential sources of exposure among Korean children and adolescents: Korean National Environmental Health Survey 2015–2017. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 236, 113781. <https://doi.org/10.1016/j.ijeh.2021.113781>.
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulangier, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., Rozet, E., 2007. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>.
- Iglesias-González, A., Hardy, E.M., Appenzeller, B.M.R., 2020. Cumulative exposure to organic pollutants of French children assessed by hair analysis. *Environ. Int.* 134, 105332. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105332>.
- James, R.A., Hertz-Pannier, I., Willman, E., Keller, J.A., Judith Charles, M., 2002. Determinants of serum polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides measured in women from the child health and development study cohort, 1963–1967. *Environ. Health Perspect.* 110, 617–624. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110617>.
- Janjua, N.R., Frederiksen, H., Slakkebaek, N.E., Wulff, H.C., Andersson, A.M., 2008. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int. J. Androl.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00841.x>.
- Kang, H.S., Kyung, M.S., Ko, A., Park, J.H., Hwang, M.S., Kwon, J.H., Suh, J.H., Lee, H.S., Moon, G.I., Hong, J.H., Hwang, I.G., 2016. Urinary concentrations of parabens and their association with demographic factors: a population-based cross-sectional study. *Environ. Res.* 146, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.032>.
- Karpuzoglu, E., Holladay, S.D., Gogal, R.M., 2013. Parabens: potential impact of low-affinity estrogen receptor binding chemicals on human health. <sb><contribution><title>J. Toxicol.</title></contribution><host><issue><series><title><mainTitle check = "true">Environ. Health Perspect. Rev.</mainTitle></title><host><series><issue></host><issue> 16, 321–335. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.809252>.
- Karzi, V., Tzatzarakis, M.N., Vakonaki, E., Alegakis, T., Katsikantami, I., Sifakis, S., Rizos, A., Tsatsakis, A.M., 2018. Biomonitoring of bisphenol A, triclosan and perfluorooctanoic acid in hair samples of children and adults. *J. Appl. Toxicol.* 38, 1144–1152. <https://doi.org/10.1002/jat.3627>.
- Karzi, V., Tzatzarakis, M., Katsikantami, I., Stavroulaki, A., Alegakis, A., Vakonaki, E., Xezonaki, P., Sifakis, S., Rizos, A., Tsatsakis, A., 2019. Investigating exposure to endocrine disruptors via hair analysis of pregnant women. *Environ. Res.* 178, 108692. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108692>.
- Katsikantami, I., Tzatzarakis, M.N., Karzi, V., Stavroulaki, A., Xezonaki, P., Vakonaki, E., Alegakis, A.K., Sifakis, S., Rizos, A.K., Tsatsakis, A.M., 2020. Biomonitoring of bisphenols A and S and phthalate metabolites in hair from pregnant women in Crete. *Sci. Total Environ.* 712, 135651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135651>.
- Kim, D.H., Lee, J.H., Oh, J.E., 2019. Perfluoroalkyl acids in paired serum, urine, and hair samples: correlations with demographic factors and dietary habits. *Environ. Pollut.* 248, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.017>.
- Knutson, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrell, B., Dinov, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, I.(Ron), Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.C., Vlemmixx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Bodin, L., Cravedi, J.P., Hallidorsson, T.J., Haug, I.S., Johansson, N., van Loveren, H., Gergelova, P., Mackay, K., Levorato, S., van Manen, M., Schwedtke, T., 2018. Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5194>.
- Kucharska, A., Covaci, A., Vanherle, G., Voorspoels, S., 2015. Non-invasive biomonitoring for PFRs and PBDEs: new insights in analysis of human hair externally exposed to selected flame retardants. *Sci. Total Environ.* 505, 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.043>.
- LaKind, J.S., Idri, F., Naiman, D.Q., Verner, M.A., 2019. Biomonitoring and nonpersistent chemicals—understanding and addressing variability and exposure misclassification. *Curr. Environ. Health Rep.* 6, 16–21. <https://doi.org/10.1007/s40572-019-0227-2>.
- Ledda, C., La Torre, G., Cinà, D., Paravazzini, G., Vitale, E., Pavone, P., Iavicoli, I., Rapisarda, V., 2018. Serum concentrations of perfluorinated compounds among children living in Sicily (Italy). *Toxicol. Lett.* 298, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.001>.
- Lehmler, H.J., Liu, B., Gadogbe, M., Bao, W., 2018. Exposure to bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S in U.S. adults and children: the National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega* 3, 6523–6532. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.B., Nakata, H., Kannan, K., 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6860–6866. <https://doi.org/10.1021/es301334j>.
- Lincho, J., Martins, R.C., Gomes, J., 2021. Paraben compounds part i: an overview of their characteristics, detection, and impacts. *Appl. Sci.* 11, 1–38. <https://doi.org/10.3390/app11052307>.
- Lindstrom, A., Strynar, M.J., Libelo, E.L., 2011. Polyfluorinated compounds: past, present, and future. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7954–7961. <https://doi.org/10.1021/es2011622>.
- Liu, B., Zhang, R., Zhang, H., Yu, Y., Yao, D., Yin, S., 2020. Levels of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in human serum, hair and nails in Guangdong Province, China: implications for exploring the ideal bio-indicator. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 184–194. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00743-w>.
- Liu, G., Cai, W., Liu, H., Jiang, H., Bi, Y., Wang, H., 2021. The association of bisphenol A and phthalates with risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052375>.
- Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P.W., Petlulu, P., Chen, X., Zhang, H., 2018. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ. Res.* 176. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>.
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2016. Analytical method for biomonitoring of endocrine-disrupting compounds (bisphenol A, parabens, perfluoroalkyl compounds and a brominated flame retardant) in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 945, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.004>.
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2019. Exposure assessment to parabens, bisphenol A and perfluoroalkyl compounds in children, women and men by hair analysis. *Sci. Total Environ.* 695, 133864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133864>.
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- Moon, M.K., 2019. Concern about the safety of bisphenol A substitutes. *Diabetes Metab.* 43, 46–48. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0027>.
- Nehring, I., Staniszewska, M., Falkowska, L., 2017. Human hair, Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*) fur and herring gull (*Larus argentatus*) feathers as accumulators of bisphenol A and alkylphenols. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 552–561. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0402-0>.
- Norén, E., Lindh, C., Glynn, A., Rylander, L., Pineda, D., Nielsen, C., 2021. Temporal trends, 2000–2017, of perfluoroalkyl acid (PFAA) concentrations in serum of Swedish adolescents. *Environ. Int.* 155. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106716>.
- Palazzi, P., Mezzache, S., Bourouiba, N., Hardy, E.M., Schritz, A., Bastien, P., Emond, C., Li, J., Soeur, J., Appenzeller, B.M.R., 2018. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in women living in the Chinese cities of BaoDing and Dalian revealed by hair analysis. *Environ. Int.* 121, 1341–1354. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.056>.
- Peng, F.J., Hardy, E.M., Béranger, R., Mezzache, S., Bourouiba, N., Bastien, P., Li, J., Zaros, C., Chevrier, C., Palazzi, P., Soeur, J., Appenzeller, B.M.R., 2020. Human exposure to PCBs, PBDEs and bisphenols revealed by hair analysis: a comparison between two adult female populations in China and France. *Environ. Pollut.* 267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115425>.
- Pirard, C., Sagot, C., Deville, M., Dubois, N., Charlier, C., 2012. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ. Int.* 48, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.003>.
- Pirard, C., Dufour, P., Charlier, C., 2020. Background contamination of perfluoroalkyl substances in a Belgian general population. *Toxicol. Lett.* 333, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.015>.

- Polachova, A., Gramblicka, T., Bechynska, K., Parizek, O., Parizkova, D., Dvorakova, D., Honkova, K., Rossnerova, A., Rossner, P., Sram, R.J., Topinka, J., Pulkabova, J., 2021. Biomonitoring of 89 POPs in blood serum samples of Czech city policemen. *Environ. Pollut.* 291, 118140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118140>.
- Ritscher, A., Wang, Z., Scheringer, M., Boucher, J.M., Ahrens, L., Berger, U., Bintein, S., Bopp, S.K., Borg, D., Buser, A.M., Cousins, I., Dewitt, J., Fletcher, T., Green, C., 2018. Zürich Statement on Future Actions on Per- And Polyfluoroalkyl Substances. 126, pp. 1–5.
- Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>.
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>.
- Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Wedebye, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? *Toxicol. Sci.* 139, 35–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030>.
- Ruan, Y., Lalwani, D., Kwok, K.Y., Yamazaki, E., Taniyasu, S., Kumar, N.J.I., Lam, P.K.S., Yamashita, N., 2019. Assessing exposure to legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances via hair – the first nationwide survey in India. *Chemosphere* 229, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.195>.
- Sako, A.V.F., Dolzan, M.D., Micke, G.A., 2015. Fast and sensitive method to determine parabens by capillary electrophoresis using automatic reverse electrode polarity stacking mode: application to hair samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 7333–7339. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8895-8>.
- Schramm, K.W., 2008. Hair-biomonitoring of organic pollutants. *Chemosphere* 72, 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.017>.
- Šramková, M., Kolářová, L., Vítčí, J., Včelák, J., Lischková, O., Starka, L., Dušková, M., 2019. Parabens and their relationship to obesity. *Endocr. Abstr.* <https://doi.org/10.1530/endoabs.63.p605>.
- Vandenbergh, L.N., Gerona, R.R., Kannan, K., Taylor, J.A., Van Breemen, R.B., Dickenson, C.A., Liao, C., Yuan, Y., Newbold, R.R., Padmanabhan, V., Vom Saal, F.S., Woodruff, T.J., 2014. A round robin approach to the analysis of bisphenol A (BPA) in human blood samples.
- Environ. Health A Glob. Access Sci. Source 13, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-25>.
- Viñas, R., Jeng, Y.J., Watson, C.S., 2012. Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2694–2714. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082694>.
- Wang, Y., Shi, Y., Vestergren, R., Zhou, Z., Liang, Y., Cai, Y., 2018. Using hair, nail and urine samples for human exposure assessment of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances. *Sci. Total Environ.* 636, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.279>.
- Wang, Y.X., Liu, C., Shen, Y., Wang, Q., Pan, A., Yang, P., Chen, Y.J., Deng, Y.L., Lu, Q., Cheng, L.M., Miao, X.P., Xu, S.Q., Lu, W.Q., Zeng, Q., 2019. Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: variability and association analysis. *Environ. Int.* 123, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.071>.
- Wei, F., Mortimer, M., Cheng, H., Sang, N., Guo, L.H., 2021. Parabens: chemicals of emerging concern in the environment and humans: a review. *Sci. Total Environ.* 778, 146150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146150>.
- WHO, 2015. Human Biomonitoring: Facts And Figures. WHO Reg. Off. Eur. Copenhagen.
- Wu, L.H., Zhang, X.M., Wang, F., Gao, C.J., Chen, D., Palumbo, J.R., Guo, Y., Zeng, E.Y., 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. *Sci. Total Environ.* 615, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.194>.
- Ye, X., Wong, L.Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., Calafat, A.M., 2015. Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000–2014. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11834–11839. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02135>.
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevorál, J., Prokešová, Zámostná, K., Kott, T., Petr, J., 2016. Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution - a review. *Czech J. Anim. Sci.* 61, 433–449. <https://doi.org/10.17221/81/2015-CJAS>.

3.2 Distribution et comparaison des niveaux de contamination dans l'urine, le sang et le cheveu

Le développement et la validation de la méthode analytique appliquée au cheveu nous ont permis de mesurer les niveaux de contamination par différents polluants chimiques de l'environnement dans cette matrice. Cependant, cette étude ne permet pas de déterminer dans quelle mesure les concentrations retrouvées dans le cheveu reflètent l'exposition des individus et la contamination interne de l'organisme. Dès lors, il est nécessaire de comparer les concentrations mesurées dans le cheveu aux concentrations déterminées dans les matrices les plus utilisées en biomonitoring humain : le sang et l'urine.

Dans la littérature, les données comparant les niveaux de contamination entre les cheveux et les matrices conventionnelles comme le sang et l'urine sont rares et souvent contradictoires, suggérant que les informations obtenues grâce aux différentes matrices peuvent être différentes. Cette disparité pourrait s'expliquer par les fenêtres d'exposition différentes que ces matrices représentent. En général, le sang et le sérum reflètent l'exposition à moyen et long terme pour les POP, tandis que l'urine fournit des informations à court terme pour les nPOP, le cheveu quant à lui offrirait une fenêtre temporelle variable allant de quelques semaines à plusieurs mois du fait de son effet mémoire (163,167,168). Cependant, les paramètres physicochimiques influençant les mécanismes d'incorporation dans le cheveu ne sont pas complètement élucidés et la contamination externe ne peut être exclue, influençant potentiellement les résultats observés (166,167,174). Par ailleurs, la plupart des études existantes se concentrent en général uniquement sur des comparaisons entre deux matrices, soit urine-cheveux, soit sang-cheveux, et couvrent généralement une gamme restreinte de produits chimiques en se concentrant sur certains types ou certaines familles de polluants (165,175,176).

Pour combler ces lacunes, l'objectif de ce travail est d'étudier les niveaux de contamination et la distribution de plusieurs polluants persistants dans le sérum et le cheveu, ainsi que de polluants non persistants dans l'urine et le cheveu afin de mieux appréhender quelle information est fournie par le cheveu par rapport aux matrices conventionnelles. Pour ce faire, huit PFAS, six PCB, trois parabènes et deux bisphénols ont été mesurés dans les échantillons sériques, urinaires et capillaires de 30 Belges sans exposition professionnelle. Les substances

cibles ont été sélectionnées pour couvrir différents profils de contamination et de persistance dans les organismes vivants.

L'analyse des échantillons dans les différentes matrices a été effectuée conformément aux procédures développées au sein du laboratoire de toxicologie. La comparaison des niveaux de contamination dans les différentes matrices a été effectuée au moyen de trois méthodes statistiques : la corrélation de Spearman, le coefficient de Kappa Cohen et le coefficient de corrélation intraclasse (ICC). La corrélation de Spearman est la méthode la plus couramment utilisée dans la littérature, elle permet de mesurer la corrélation c'est-à-dire l'association de changement entre deux variables. L'avantage de l'ICC est de prendre en compte non seulement la corrélation, mais également l'accord entre deux méthodes de mesure différentes c'est-à-dire de mesurer la corrélation en tenant compte du biais des méthodes et de la reproductibilité des résultats (177,178). Le coefficient de Kappa Cohen permet, quant à lui, de mesurer l'accord entre deux méthodes de mesure lorsque la valeur donnée est qualitative. Dans notre cas, les valeurs des concentrations volumétriques ont été converties en variables qualitatives en classant les concentrations mesurées dans des quartiles de contamination établis sur la base des valeurs des percentiles les plus pertinents dans littérature. L'accord entre les classements dans les différentes matrices, en tenant compte de la composante aléatoire de ce dernier, est ainsi mesuré par le calcul du coefficient de Kappa Cohen (179).

Les détails de l'étude, les résultats ainsi que la discussion sur les différents paramètres pouvant influencer les résultats sont décrits dans la publication 3.

Troisième publication

Contamination levels and distribution of persistent and non-persistent pollutants in paired hair, urine and serum samples from a Belgian non-occupationally exposed population

Julien Claessens, Patrice Dufour, Nadia Dardenne, Corinne Charlier, Catherine Pirard

Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A, **88**, 447–462 (2025).

Contamination levels and distribution of persistent and non-persistent pollutants in paired hair, urine and serum samples from a Belgian non-occupationally exposed population

Julien Claessens ,^{a,b} Patrice Dufour^{a,b}, Nadia Dardenne^c, Corinne Charlier^{a,b}, and Catherine Pirard^{a,b}

^aDepartment of Clinical, Forensic, Environmental, and Industrial Toxicology, University Hospital of Liege, Liege, Belgium; ^bCenter For Interdisciplinary Research on Medicines (C.I.R.M), University of Liege, Liege, Belgium; ^cUniversity and Hospital Biostatistics Center (B-STAT), Faculty of Medicine, University of Liege, Liege, Belgium

ABSTRACT

Designing ideal human biomonitoring studies involves the selection of reliable markers of exposure in adequate biological matrix. Besides conventional matrices such as blood or urine, hair has been increasingly investigated as a promising noninvasive alternative. However, understanding the pollutant distribution between differing biological compartments is essential for reliable interpretation of data collected. Therefore, the contamination levels and the distribution of some persistent (8 perfluoroalkyl substances – PFAS – and 6 polychlorobiphenyls – PCBs) and non-persistent pollutants (2 bisphenols and 3 parabens) were investigated in paired serum and hair samples, or paired spot urine and hair samples obtained from 30 Belgian non-occupationally exposed individuals. The levels measured were close to those reported in recent larger-scale studies. PFAS, PCB and bisphenol distributions largely differed depending upon the matrix and within the same chemical family depending upon the congener. The correlation and agreement between pollutant levels in differing matrices demonstrated that the information provided is comparable only for highly chlorinated PCBs and parabens, while the classification of exposure for bisphenols was substantially different according to the matrix. The selection of the human matrix thus remains complex and might markedly bias the results obtained, especially when assessing the health risk related to chemical exposure.

KEYWORDS

Biomonitoring; contamination levels; hair; serum; urine; paired samples

Introduction

The presence of chemical products in our environment is ubiquitous, and thus, continuous exposure to cocktails of substances occurs (Naidu et al. 2021; UNEP 2019). To accurately assess human exposure to environmental pollutants, human biomonitoring (HBM), consisting of the measurement of chemicals and pollutants in biological matrices, has been demonstrated to be an efficient tool since it accounts for all routes and sources of exposure (Shilnikova et al. 2025; Vorkamp et al. 2021). Several biological matrices, such as blood, urine, fat tissues, and maternal milk have been used depending upon the target chemicals and their toxicokinetic (Shilnikova et al. 2025). For persistent organic pollutants (POPs), which are known to be stable and accumulate in living organisms, blood has traditionally been the preferred matrix. In fact,

blood might effectively reflect internal dosing due to its contact with the whole organism. Further, for some lipophilic compounds such as PCBs, lipid adjustment of the chemical concentration enables their levels to be reflected in the lipid compartment where these compounds accumulate (Schettgen et al. 2015; Vorkamp et al. 2021). For non-persistent chemicals that are rapidly metabolized and excreted, urine samples are usually collected for the measurement of the chemical itself or its metabolites (Roggeman et al. 2022). Both conventional sample types suffer from several drawbacks, mainly the invasiveness of the sampling for blood and the high intra-individual variability for urine spot samples. Therefore, the use of alternative matrices like nails, saliva, or hair has been increasingly investigated (Alves et al. 2014; Appenzeller and Tsatsakis 2012; Jian et al. 2018). While hair has

CONTACT Julien Claessens  julien.claessens@uliege.be  Department of Clinical, Forensic, Environmental, and Industrial Toxicology, University Hospital of Liege, Quartier de l'Hôpital – Avenue de l'Hôpital 1, Bat B35, Liege 4000, Belgium
 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/15287394.2025.2451676>

© 2025 Taylor & Francis Group, LLC

been predominantly employed for many years within the field of forensic or clinical toxicology because of the incorporation of chemicals from blood into hair roots, the interest in its use to monitor environmental pollutants is more recent. The key advantages of this method come from the simplicity and affordability of the sampling procedure, the non-critical storage conditions required, and its particular suitability for vulnerable populations including infants, children or elderly (Alves et al. 2014; Appenzeller 2015; Appenzeller and Tsatsakis 2012; Schramm 2008). Despite the increasing number of investigations focusing on environmental pollutants in hair, levels of these pollutants in the general population using a hair matrix are not as well documented compared to traditional matrices. This might be due to (1) analytical challenges of reaching appropriate sensitivity, (2) difficulties in differentiating internal from external contamination, (3) lack of reference materials, or (4) questionable representativeness of the body burden (Junaid et al. 2024; Vorkamp et al. 2021). Nevertheless, hair still constitutes a promising alternative matrix, and a rising number of studies were conducted on hair contamination of several chemical classes aiming to investigate the reliability of hair for assessing human exposure (Junaid et al. 2024; Lallmahomed et al. 2024). Weak or missing correlations between contaminant levels in conventional matrices and hair were frequently observed indicating that the information provided by the different matrices may vary (Faÿs et al. 2021; Hardy et al. 2021; Hernández et al. 2019; Kim, Lee, and Oh 2019; N. Li et al. 2021; Wang et al. 2018). Indeed blood, urine and hair chemical levels are related to different time windows of exposure: (1) blood is usually considered to accurately measure medium-to long-term exposure to POPs, (2) urine provides information on very recent exposure, from a few hours to a few days, to rapidly metabolized chemicals (Calafat et al. 2016; Engel et al. 2014; LaKind et al. 2019; Roggeman et al. 2022) and (3) hair might encompass an extended window of detection depending upon the strand length analyzed,

ranging from few weeks to few months (considering a mean of 1 cm/month of growth). The mechanisms of chemical incorporation into hair are still not fully elucidated and external contamination might not be excluded (Alves et al. 2014; Appenzeller 2015; Appenzeller and Tsatsakis 2012; Schramm 2008). Although data gathered from these matrices may be complementary, the adequate selection of biomarkers and matrices for designing biomonitoring, as well as reliable interpretation of data collected, are substantial and further investigations are needed to improve knowledge and understanding of the pollutant distribution between the different biological compartments (Lallmahomed et al. 2024; Vorkamp et al. 2021). Studies examining contamination levels in different paired sample types remain scarce, usually focusing either on hair-blood or hair-urine paired samples and rarely on more than two biological matrices. Further, few investigations cover a wide range of different chemical classes of substances. Wang et al. (2018) compared the results obtained in paired serum, urine, hair and nail samples but only for 8 perfluoroalkyl substances (PFAS), while Faÿs et al. (2021) noted the levels for a total of 29 chemically closed substances including phthalates, bisphenols, or pesticides. Hardy et al. (2021) examined a larger number of different pesticides (organochlorines, organophosphates, pyrethroids, and carbamates) but only in hair and urine samples. However, the distribution of chemicals between different body compartments and thus between varying available biological matrices needs to be at least partly determined by their physicochemical properties (Chata et al. 2016), which might differ widely depending upon the targeted chemical family and sometimes even within the same chemical class.

To fill this gap, the aim of this study was to examine the contamination levels and distribution of some persistent and non-persistent pollutants between different biological matrices. For these purposes, 8 PFAS including perfluoropentanoic acid (PFPeA), perfluorohexanoic acid, (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluoroctanoic

acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluorohexanesulfonate (PFHxS), and linear perfluorooctanesulfonate (PFOS), 6 polychlorobiphenyls (PCB-28, -52, -101, -138, -153, and -180), three parabens (methyl-, ethyl- and propylparaben), and two bisphenols (BPA and BPS) were measured in paired serum and hair samples, or paired spot urine and hair samples from 30 Belgian non-occupationally exposed individuals. These target chemicals were selected to cover different elimination and persistence profiles. The levels measured are discussed as follows (1) in light of available literature, (2) occurrence and distribution between matrices, and (3) factors influencing the incorporation rate of chemicals in hair. This short preliminary study was initially aimed to help in the selection of the most suitable markers in the perspective of an upcoming epidemiological study assessing the relationship between persistent and non-persistent pollutant exposure and diabetes pathologies.

Material and method

Population and sample collection

A subgroup of 30 individuals was selected among a larger sample of healthy volunteers recruited within the frame of a future study approved by the Hospital Faculty Ethics Committee of the University of Liege (N°2016–296), predominantly through the Belgian Red Cross blood donation centers from the Province of Liege (Belgium), and to a lesser extent from the staff of the University and the University Hospital of Liege. A blood sample, a single spot urine sample and strand of hair was obtained from all 30 volunteers in the present study. Participants were aged from 22 to 60 years old (average of 30.5 years) and included 12 men and 18 women without known occupational exposure to the targeted environmental pollutants.

Hair samples (0.5–1 g) were cut near the scalp at the occipital cranial region and were directly stored in paper envelope in dark room at ambient temperature until analysis. Analyses were performed on the two first proximal centimeters (oriented from the scalp). To remove the external

contamination, hair was washed successively in water, sodium dodecyl sulfate in water (0.1% m/v) and two times again in water (Claessens, Pirard, and Charlier 2022).

Urine samples were collected in 100 ml polypropylene vessels, whereas blood samples were collected in clot activator tubes (without gel) and centrifuged to collect serum. Both urine and serum samples were stored at –20°C until analysis.

Analytical procedure

Serum PFAS

PFAS were extracted from serum samples following the procedure previously described in Dufour et al. (2018). In brief, 1 ml sample was acidified with formic acid before being extracted by solid phase extraction using Oasis WAX cartridge (Waters). After the elution using 2 × 2 ml NH₄OH in methanol (MeOH) (2%), extracts were evaporated until dryness and reconstituted in 80 µl mixture of ammonium acetate in water (2 mm) and in acetonitrile (2 mm) in proportion 8/2 (v/v). Samples were analyzed using Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometer (MS/MS). Limits of quantification (LOQs) are gathered in supplementary material (Table S1). Each sequence consisted, in addition to unknown samples, in one procedural blank and two reference materials from the Arctic Monitoring and Assessment Program (AMAP) ring test for organic pollutants organized by the Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) to ensure the accuracy of the analyses. The sequence was validated if the levels of the reference materials measured were included in the tolerable ranges provided by the ring test organizers.

Serum PCBs

PCBs in serum were measured using the method previously described by Cirello et al. (2024). Briefly, after the addition of internal standard, the serum sample (1 ml) was treated with 0.3 ml acetic acid before a double liquid-liquid extraction using 4 ml hexane/acetone mixture (95/5 v/v). The combined organic layers were evaporated

until 500 µl eluted on a PHREE cartridge, and concentrated at room temperature in 50 µl nonane as keeper. The final determination was performed by gas chromatography (GC) coupled to MS/MS. The analytical method and conditions are fully detailed in supplementary materials, as well as the LOQs (Table S1). Each sequence consisted, in addition to unknown samples, in one procedural blank and two reference materials from the AMAP ring test for organic pollutants (INSPQ) to ensure the accuracy of the analyses. The sequence was validated if the levels of the reference materials measured were included in the tolerable ranges provided by the ring test organizers.

PFAS, parabens, and bisphenols in hair

Hair samples were treated for PFAS, paraben, and bisphenol determination as already reported by Claessens, Pirard, and Charlier (2022). Briefly, washed hair samples were cut into 1–2 mm segments using stainless steel scissors. Fifty mg washed hair were weighed and introduced into clean glass tubes, spiked with 10 µl isotopically mass-labeled internal standard (0.1 µg/ml for PFAS and 5 µg/ml for all other compounds) and let equilibrate at ambient temperature for one hr. Two ml MeOH/acetic acid mixture (85/15 v/v) were then added, and tubes were incubated at 38°C overnight. After incubation, samples were sonicated for 15 min with 2 × 2 ml acetone and centrifuged for 10 min. Supernatants were collected and evaporated to dryness at 30°C under a nitrogen flow. Extracts were finally reconstituted with 100 µl ammonium acetate 2 mm in water and MeOH (70/30 v/v) and transferred into vials for further analysis by UHPLC-MS/MS. LOQs are gathered in supplementary material (Table S1). Procedural blank and home-made QC (spiked at 100 and 1000 pg/mg for BPA, PrP, MeP and PFOS, 20 and 200 pg/mg for BPS and EtP, and 2 and 20 pg/mg for the other PFCs) were added to the unknown sample series to ensure accuracy of the method.

Hair PCBs

The hair samples previously washed and cut in small pieces (50 mg) were hydrolyzed by ultra-

sonication with 1 ml NaOH 5 M until total dissolution. Then the hydrolyzate was extracted similarly to acidified serum samples and analyzed using the same GC-MS/MS method. The analytical method and conditions are fully detailed in supplementary materials, as well as the LOQs (Table S1).

Urine bisphenols

Bisphenol (namely BPA and BPS) analysis was previously described (Pirard and Charlier 2022). Briefly, 3 ml urine were initially enzymatically hydrolyzed using β glucuronidase and sulfatase in 750 µl sodium acetate buffer (pH 5) for 30 min at 40°C. Samples were then extracted by solid phase extraction on Oasis HLB SPE Cartridge (Waters), followed by a liquid/liquid extraction using 3 ml ethyl acetate, and then derivatized using (N-methyl-N-(trimethylsilyl))trifluoroacetamide. The determination was performed using GC-MS /MS. LOQs are gathered in supplementary material (Table S1). Each sequence consisted, in addition to unknown samples, in one procedural blank and two reference material samples: one from the German External Quality Assessment Scheme for Analysis in Biological Materials (G-EQUAS; material 14/15) and another from the External Quality Assessment Scheme for Organic Substances in Urine (OSEQUAS) provided by the INSPQ. The sequence was validated if the levels of the reference materials measured were included in the tolerable ranges provided by the ring test organizers.

Urine parabens

The extraction and determination of parabens (namely methylparaben (MeP), ethylparaben (EtP) and propylparaben (PrP)) were carried out following the method previously developed and validated by Dewalque et al. (2014). The extraction consisted in the enzymatic hydrolysis of 3 ml urine sample using β glucuronidase followed by a solid phase extraction on Bond Elut certify LRC cartridge. The analysis was performed using UHPLC-MS/MS. LOQs are gathered in supplementary material (Table S1).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R (version 4.0.3) with packages VCD and irr and Excel (Microsoft office 2013). Results below LOQ were replaced by $LOQ/\sqrt{2}$ (Sun et al. 2018). The normality of data distribution was assessed by a Shapiro Wilk's test. Because all distributions were highly skewed, non-parametric test was used (Spearman correlation). All statistical analyses were performed for chemicals showing a detection frequency (DF) above 50%, using the significance threshold set at the 5% critical level ($p < 0.05$). Correlations between pollutant concentrations within the matrices were assessed by Spearman's correlation test to highlight potential common sources of exposure. Comparisons inter-matrices were carried out using Spearman's correlation coefficient, weighted Cohen's kappa coefficient (κ) and two-way fixed Intraclass Correlation Coefficients (ICC (A, 1) with 95 CI%. Weighted Cohen's kappa coefficient was calculated to evaluate the concordance of the classification of the contamination levels between the different matrices (McHugh 2012). Contamination values were converted into categorical variables by classifying obtained results between cutoffs for each

matrix. The cutoffs were determined based on the percentile values previously reported in other bio-monitoring studies selected to provide the more recent and as similar as possible monitoring data in terms of biological matrix and populations. These data and references are reported in supplementary materials (Table S2). Cutoffs, attributed classifications and weights used for each chemical depending on the matrix are presented in supplementary materials (Tables S3–S4). Cohen's kappa concordance value > 0.90 was interpreted as almost perfect agreement, value between 0.80 and 0.89 as strong, value between 0.60 and 0.79 as moderate value between 0.40 and 0.59 as weak, value between 0.20 and 0.39 as minimal, and value < 0.20 means no agreement (McHugh 2012). The two-way fixed ICC reflects the degree of correlation but also the agreement between measurements (Koo and Li 2016) and were calculated using standardized concentrations by mean and standard deviation (Bro and Smilde 2003). Concentrations were log-transformed to approximate a normal distribution. Reliability values of ICC range between 0 and 1, with 1 meaning strongest reliability or agreement (Koo and Li 2016).

TABLE 1. Detection Frequencies ($N > \text{log}$), Geometric Mean (GM), Percentiles and Minimal and Maximal Concentrations Measured in the 30 Paired Hair and Urine Samples, and Hair and Serum Samples

	Hair (pg/mg)							Serum (µg/L)						
	N>LOQ	GM	P25	P50	P75	P95	Min-max	N>LOQ	GM	P25	P50	P75	P95	Min-max
PCBs														
PCB-28	23.3%	<0.25	<0.25	<0.25	0.26	0.30	<0.25–0.39	0.0%	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	–
PCB-52	36.7%	<0.25	<0.25	<0.25	0.30	0.36	<0.25–0.55	0.0%	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	–
PCB-101	53.3%	0.27	<0.25	0.26	0.35	0.45	<0.25–0.51	0.0%	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	–
PCB-138	50.0%	0.40	<0.25	0.43	0.60	0.75	<0.25–0.62	100.0%	0.048	0.028	0.044	0.065	0.134	0.021–0.548
PCB-153	63.3%	0.28	<0.25	0.28	0.39	0.46	<0.25–0.99	100.0%	0.065	0.038	0.057	0.101	0.191	0.028–1.09
PCB-180	43.3%	<0.25	<0.25	0.26	0.27	0.43	<0.25–0.70	100.0%	0.036	0.019	0.025	0.065	0.173	0.012–0.878
PFAS														
PFPeA	0.0%	<0.32	<0.32	<0.32	<0.32	<0.32	–	0.0%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	–
PFHxA	10.0%	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.22	<0.2–37.4	0.0%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	–
PFHpA	3.3%	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2–0.22	0.0%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	–
PFOA	76.7%	0.27	<0.2	0.25	0.35	0.67	<0.2–1.30	96.7%	1.35	1.04	1.35	1.70	3.44	<0.5–8.42
PFNA	10.0%	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.32	<0.2–1.19	96.7%	0.41	0.33	0.46	0.56	1.04	<0.1–1.63
PFDA	6.7%	<0.27	<0.27	<0.27	<0.27	0.40	<0.27–2.19	83.3%	0.18	0.15	0.19	0.27	0.40	<0.1–0.89
PFHxS	3.3%	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2–0.24	90.0%	0.45	0.28	0.53	0.75	1.32	<0.15–6.46
PFOS	10.0%	<10	<10	<10	<10	16.2	<10–36.0	100.0%	1.88	1.33	1.71	2.55	4.07	0.59–11.2

TABLE 2. Spearman Correlation Coefficients Between Chemical Levels Measured in Hair (*p*-value in Parentheses). Significant Correlations are Highlighted in Bold (*p* < 0.05)

	HAIR								
	PCB-101	PCB-138	PCB-153	PCB-180	BPA	BPS	MeP	EtP	PrP
PCB-101	–								
PCB-138	0.794 (<i>p</i> < 0.0001)	–							
PCB-153	0.674 (<i>p</i> = 0.0004)	0.883 (<i>p</i> < 0.0001)	–						
PCB-180	0.399 (<i>p</i> = 0.0593)	0.651 (<i>p</i> = 0.0008)	0.542 (<i>p</i> = 0.0076)	–					
BPA					–				
BPS					–0.093 (<i>p</i> = 0.6244)	–			
MeP						–			
EtP						0.561 (<i>p</i> = 0.0013)	–		
PrP						0.429 (<i>p</i> = 0.0181)	0.274 (<i>p</i> = 0.143)	–	

Results and discussion

Descriptive statistics are reported in Table 1, which includes the detection frequencies (DF), geometric means (GM), percentiles and concentration ranges measured according to the matrix. PCBs and PFAS were not measured in urine samples because of the poor urinary excretion of these substances and, subsequently, the expected low urinary levels and detection frequencies (Genuis, Beesoon, and Birkholz 2013; G. Zheng, Eick, and Salamova 2023). Similarly, even if it was previously successfully measured in blood in previous studies, bisphenols and parabens were not measured in the present serum samples due of the higher concentration of these compounds and their metabolites observed in urine (LaKind et al. 2019; Vorkamp et al. 2021) and the limited literature reporting serum levels for comparison (Vorkamp et al. 2021). Spearman's correlations between pollutants within each matrix were reported in Tables 2–4, whereas the results of the inter-matrix comparisons (Spearman correlation, weighted Cohen's kappa and ICC) were gathered in Table 5.

PCBs levels in hair and serum

As expected, PCB-28, -52 and -101 were not detected in serum samples based on our LOQs (from 0.015 to 0.020 µg/L), while the most abundant was PCB-153 accounting for 42% of the sum of PCBs, followed by PCB-138 and PCB-180. These levels are far lower than those reported from

a study on Walloon adults recruited in 2015 (Pirard et al. 2018), from the French ESTEBAN study conducted between 2014 and 2016 (Balestier et al. 2021), or from the German general population within 2010 and 2014 (Schettgen et al. 2015). This is in agreement with the declining trends observed these last decades due to the strict regulations concerning their uses and disposals established at the end of 1980's, and the creation of the "dirty dozen" blacklist within the Stockholm Convention (EU, 1996 ; Pirard et al. 2018; Schettgen et al. 2015). A similar profile was found in hair samples for higher chlorinated congeners, with PCB-153 being the congener detected the most frequently and in the highest concentration levels (DF: 82.6%; P50: 0.43 pg/mg). On the other hand, lower chlorinated PCBs seemed to be present in higher proportions in hair compared to serum. Comparisons between both matrices are difficult for these congeners due to the inability to detect them in serum. Therefore, it was not possible to determine if this trend is driven by the higher sensitivity of the analytical method developed for hair (and thus its greater suitability), or if the profiles of PCBs in serum and hair are actually different regarding the chlorination degree of congeners. According to J. Zheng et al. (2016), within an occupational context (Chinese e-waste recycling facility), air would be the primary source of PCB contamination in hair predominantly through external deposition, especially for lower chlorinated congeners, while blood contribution (and thus internal exposure) would be lower. Even if

TABLE 3. Spearman Correlation Coefficients Between Chemical Levels Measured in Serum (*p*-value in Parentheses). Significant Correlations are Highlighted in Bold (*p* < 0.05)

	SERUM							
	PCB138	PCB153	PCB180	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA
PCB-101								
PCB-138	–							
PCB-153	0.965 (<i>p</i> < 0.0001)	–						
PCB-180	0.919 (<i>p</i> < 0.0001)	0.950 (<i>p</i> < 0.0001)	–					
PFHxS				–				
PFOA				0.544 (<i>p</i> = 0.0019)	–			
PFNA				0.501 (<i>p</i> = 0.0048)	0.485 (<i>p</i> = 0.0065)	–		
PFOS				0.528 (<i>p</i> = 0.0027)	0.234	0.580 (<i>p</i> = 0.0008)	–	
PFDA				0.609 (<i>p</i> = 0.0004)	0.434 (<i>p</i> = 0.0167)	0.781 (<i>p</i> < 0.0001)	0.649 (<i>p</i> = 0.0001)	–

TABLE 4. Spearman Correlation Coefficients Between Chemical Levels Measured in Urine (*p*-value in Parentheses). Significant Correlations are Highlighted in Bold (*p* < 0.05)

	URINE				
	BPA	BPS	MeP	EtP	PrP
BPA	–				
BPS	0.697 (<i>p</i> < 0.0001)	–			
MeP			–		
EtP			0.707 (<i>p</i> < 0.0001)	–	
PrP			0.624 (<i>p</i> = 0.0002)	0.418 (<i>p</i> = 0.0214)	–

markedly lower air contribution might occur during environmental exposure, this pathway should not be neglected, and differentiation between internal and external contamination sources is still a hindrance to the use of hair in biomonitoring studies. Although few studies reported PCB levels in hair from European populations, concentrations measured are in the same range as those previously reported from French populations (Iglesias-

González, Hardy, and Appenzeller 2020; Peng et al. 2020) and lower than hair results observed in Luxembourg (Peng et al. 2021). In serum as well as in hair, PCB-138, -153 and -180 levels were significantly correlated (Tables 2 and 3), suggesting common sources of exposure.

The results of the inter-matrix correlations (Table 5) show significant Spearman's coefficient and ICC for PCB-180, and the agreement between

TABLE 5. Results of the Inter-Matrix Correlations Using Spearman Correlation, Weighted Cohen's Kappa and Two-Way Fixed Intraclass Correlation

Compounds	Spearman correlation		Weighted Cohen's kappa			ICC			
	Coefficient	<i>p</i> -Value	K	95%CI		Agreement	Value	Lower CI	Upper CI
<i>Hair vs serum</i>									
PCB-138	0.343	0.110	–	–	–	–	0.553	0.185	0.783
PCB-153	0.308	0.152	0.015	–0.183	0.213	none	0.513	0.128	0.761
PCB-180	0.508	0.0134	0.388	0.088	0.689	minimal	0.695	0.402	0.859
PFOA	0.109	0.565	0.026	–0.151	0.203	none	0.145	–0.235	0.481
<i>Hair vs urine</i>									
BPA	–0.002	0.994	–0.084	–0.306	0.139	none	–0.238	–0.569	0.142
BPS	–0.256	0.173	–0.118	–0.444	0.207	none	–0.138	–0.489	0.239
MeP	0.358	0.0522	0.356	0.078	0.634	minimal	0.329	–0.039	0.615
EtP	0.657	<0.001	0.446	0.220	0.672	weak	0.622	0.338	0.801
PrP	0.381	0.0380	0.495	0.193	0.798	weak	0.215	–0.163	0.534

matrices according to Cohen's kappa was found as "minimal." This indicates that levels in hair and serum might present a similar reliability for the PCB-180 exposure assessment even if the agreement is poor according to Cohen's kappa value. For PCB-138 and -153, ICC were significant but lower than for PCB-180, while no significant correlation nor agreement were observed between both matrices (for PCB-153 only, Cohen's kappa could not be evaluated for PCB-138 due to the low detection frequencies observed in the reference population used for the cutoff determination). Even with the use of three different statistical methods to compare concentrations obtained in different matrices enabling a more reliable and cautious interpretation of correlation results, these conclusions are globally consistent with previous findings reporting positive correlations between hair and serum concentrations for some PCBs (Barmpas et al. 2020; J. Zheng et al. 2016). These correlations or agreements between matrices support the hypothesis of an effective transfer from blood circulation to hair, enhanced by the high lipophilicity of these substances which facilitates their diffusion across cell membranes and incorporation into a lipid-rich matrix such as hair (containing 3.5–4% of lipids vs 0.2–1% for blood) (Cone 1996; Hsu et al. 2022; Junaid et al. 2024).

PFAS levels in hair and serum

PFPeA, PFHxA and PFHpA were detected in few hair samples (respectively 0%, 10% and 3.3%) and in none of the serum samples. For all other PFAS, serum was widely contaminated (more than 80% of the samples measured), while hair contamination was mainly dominated by PFOA, the other PFAS being positively measured in less than 10% of the samples. These low detection frequencies for PFAS other than PFOA were previously reported by Claessens, Pirard, and Charlier (2022), indicating the poorer suitability of PFAS hair measurements compared to serum measurements and/or the low sensitivity of the analytical method used compared to the low levels to detect.

The serum PFAS levels are consistent with those observed in populations from Wallonia and with

levels measured in Germany and France (Fillol et al. 2021; Göckener et al. 2020; Pirard, Dufour, and Charlier 2020) but lower than those observed in a Flemish population (Colles et al. 2020). The latter were collected from an older population recruited a decade ago, confirming either the worldwide temporal decline trend and/or the regional difference in exposure previously observed for PFAS in Belgium (Dufour et al. 2018; Pirard, Dufour, and Charlier 2020). The levels measured in hair were in the same range as those noted in the literature (Claessens, Pirard, and Charlier 2022; Kim, Lee, and Oh 2019; Martín et al. 2019). These comparisons demonstrated that despite the small sample size of the present population, the participants recruited experienced usual background exposure.

Correlation was not performed between PFAS in hair because of the low DF. All PFAS (except PFOS and PFOA) levels were significantly correlated in serum (Table 3) suggesting that common exposure sources are occurring, rather through the environmental accumulation of these "forever" chemicals than through their individual uses in consumer products (De Silva et al. 2021; Glüge et al. 2020).

Despite the statistical test carried out (Table 5), no significant correlation nor agreement was found for PFOA concentrations between serum and hair. The results of association between hair and serum levels of PFAS reported in the literature have been inconsistent. While few investigators found significant association between hair and serum levels of PFOS or PFOA (Kim, Lee, and Oh 2019; J. Li et al. 2013), others did not report any correlation between both matrices (J. Li et al. 2013; Liu et al. 2020; Wang et al. 2018). This lack of correlation between serum and hair PFAS levels was not expected for such persistent compounds. Indeed, the incorporation of chemicals is thought to occur into the hair root follicles from the surrounding blood capillaries and mainly influenced by blood concentration and contact time (Chata et al. 2016; Junaid et al. 2024). Therefore, since, like PCBs, PFAS are known to be poorly metabolized and eliminated from the organism, leading to their blood levels

being relatively constant (Knutsen et al. 2018; LaKind et al. 2019; Schettgen et al. 2015), correlations between serum and hair levels might be expected to compare to those observed for some PCBs. On the other hand, the incorporation rate into the hair matrix may also be influenced by the affinity of the compound for hair components (i.e. proteins, melanin, lipids) and the affinity for blood proteins (Carnevale et al. 2014; Cone 1996; Lallmahomed et al. 2024) which might limit the transfer from blood for PFAS, known to be strongly bound to serum albumin (Fischer et al. 2024). These differences in matrix affinity between PFAS and PCBs resulting in a lower hair incorporation rate for PFAS are also suggested by their comparable or even lower hair levels compared to PCBs, whereas PFAS serum concentrations were roughly 100-fold higher than PCB levels.

Bisphenol levels in hair and urine

The urinary and hair levels of bisphenols measured in the present study are similar to those reported in previous Belgian studies on a larger population

(Claessens, Pirard, and Charlier 2022; Pirard and Charlier 2022). Bisphenol A was the predominant bisphenol in urine and hair, with a median value of 0.74 µg/L (DF: 97%) and 38.3 pg/mg (DF: 83%), respectively. BPS was detected in less than 40% of the urine samples despite the lower LOQ (vs BPA), and all hair strands presented quantifiable levels close to those measured for BPA. Although having similar chemical structures, the additional sulfur atom in BPS may impact its binding to hair keratin (Cao et al. 2024) and/or its metabolism and renal excretion, and therefore might explain at least partly, the different distribution between urine and hair observed for BPA and BPS, as highlighted in Figure 1. The correlation between BPA and BPS hair levels on one hand, and the lack of significant correlation in urine (Tables 2 and 4) on the other confirm the different behavior of both bisphenols within both matrices.

The comparison between urinary and hair levels did not highlight any correlation nor agreement between both matrices (Table 5). This lack of correlation was expected since bisphenol urinary levels was demonstrated to widely vary from day to day and even within a day. In fact, their high intra-individual variability, reflecting very short-term exposure (few hours), suggests a poor accuracy of a single spot urine sample in representing mid-term exposure (LaKind et al. 2019; Roggeman et al. 2022). In contrast, hair has been considered to cover a wider exposure window, from a few weeks to several months depending on the strand length (Alves et al. 2014; Appenzeller 2015). In addition, the variability of bisphenol levels in hair was demonstrated to be lower compared to urine and depending on the bisphenol (higher reliability for BPS compared to BPA) (Faÿs et al. 2021). This difference in the temporal exposure window covered by the two matrices might result in different information being provided: peaks or valleys of exposure occurring within a day highlighted by the urinary levels (depending on the timing of sample collection), and levels averaged and smoothed over several weeks or months provided by hair chemical levels. Another difference between urine and hair comes from the species measured in both matrices. Because bisphenols are rapidly metabolized and eliminated in urine as conjugated compounds (sulfo- and glucuro-conjugates)

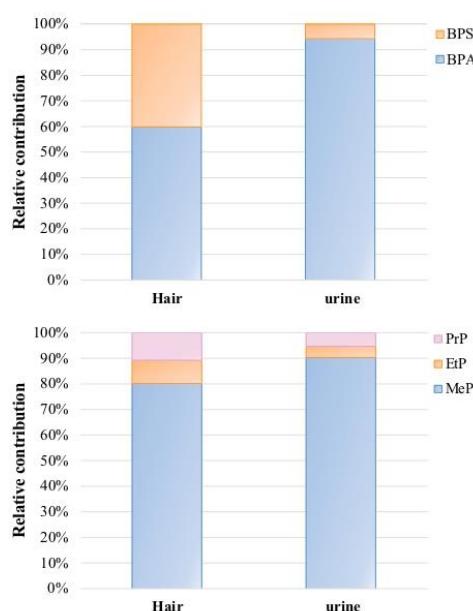


FIGURE 1. Relative contributions of individual compound levels to the corresponding total concentrations.

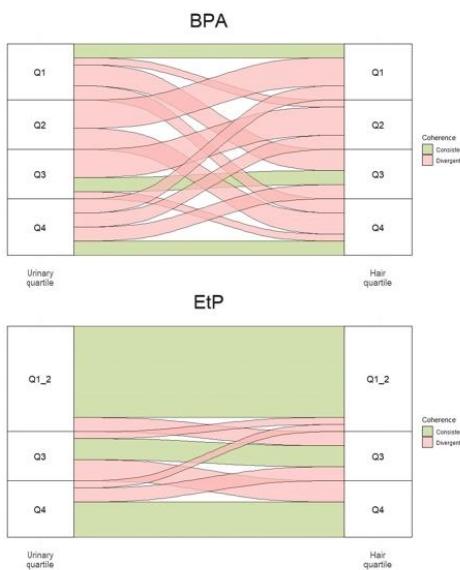


FIGURE 2. The classification of exposure for each individual according to the quartile of contamination in both matrices for BPA and EtP. Divergent and consistent classifications are represented respectively in pink and green.

(Dekant and Volkel 2008), the sum of free and conjugated bisphenols was measured in urine within the present study, while free bisphenol levels were determined using hair samples. Indeed, it was expected that mainly unconjugated bisphenols might be incorporated from blood into hair as previously observed for phthalate metabolites because highly hydrophilic and large molecules might readily penetrate biological membranes (Hsu et al. 2022). Since the unconjugated form is thought to be responsible for the endocrine disrupting properties of bisphenols (Ma et al. 2019), their measurements in hair may be relevant from a toxicological perspective. However, the information provided by hair and urinary levels is definitively different, as already suggested by Faÿs et al. (2021), making the selection of the best marker in epidemiological studies aiming to investigate associations between chemical exposure and health outcomes uncertain. Figure 2 represents the exposure classification of individuals according to the quartile of contamination in both matrices for BPA and EtP. For BPA, few participants were similarly classified using urinary or hair levels (also

demonstrated by the lack of agreement according to the Cohen's kappa value), indicating that depending upon the matrix selected, the classification of the exposure level may vary thus strongly influencing the association evaluation between exposure and health outcomes.

Paraben levels in hair and urine

As expected, and previously reported, MeP was the most abundant paraben measured in urine and hair with a median of respectively 3.06 µg/L and 37.1 pg/mg, far higher than EtP and PrP. Once again, levels measured in the urine and hair from our small population are close to those obtained on similar larger-sized populations (Claessens, Pirard, and Charlier 2022; Pirard and Charlier 2022). These urinary levels are also similar to the results detected the French ESTEBAN study (Fillol et al. 2021), but lower than the concentrations measured in the urine of Spanish breastfeeding mothers (Sanchis et al. 2020). This might be due to different use profile of cosmetics between countries or subpopulations. Similarly, the paraben concentrations measured in hair samples were largely lower than those found in the hair of a small Spanish or Polish cohort (Martín et al. 2019; Wojtkiewicz et al. 2021). The profile of parabens observed in urine and hair does not seem to be markedly different, the contribution of PrP being lower in urine than hair (Figure 1). As previously observed MeP levels are significantly correlated with EtP and PrP in both matrices (Devalque, Pirard, and Charlier 2014; Tian et al. 2023) as presented in Tables 2 and 4 reflecting the combined use of parabens in their applications such as cosmetics or food (Janjua et al. 2008; Soni, Carabin, and Burdock 2005).

Significant correlations between urinary and hair levels were detected for EtP regardless of the statistical test used (significant Spearman coefficient and ICC, Cohen's kappa value representing a significant weak agreement). The consistency of the distribution within quartiles of contamination in urine and hair paired samples for EtP is also depicted in Figure 2, largely contrasting with the trend observed for BPA. PrP also showed a significant weak agreement and Spearman's coefficient, but the ICC did not

indicate any correlation due to a lower detection frequency especially in urine, which decreases the statistical effectiveness of the test. These correlations and agreement between urine and hair levels were not surprising. Indeed, on one hand, the regular habits in the daily cosmetic and personal care product applications (main paraben sources of exposure) leads to a fairly reproductive day-to-day exposure. On the other hand, the specificity of dermal absorption tends to reduce peak and valley concentrations compared to oral intake (Braun et al. 2012; Philippat et al. 2015). Both of these factors might result in low intra-individual variability of urinary paraben levels and therefore a fair reliability of urine spot samples to represent mid- to long-term paraben exposure (Braun et al. 2012; Dewalque et al. 2015; LaKind et al. 2019), a time window of exposure comparable to the one covered by hair analysis. Conversely, no marked correlation was demonstrated for MeP according to Spearman and ICC, and only minimal agreement was observed between the classification in both matrices. Although Tian et al. (2023) also found a lack of correlation between hair and urine levels for several parabens, this inconsistency in the behavior of the three studied parabens was not expected, since all three demonstrated similar chemical structures. However, the different lengths of the carbon chain might influence the incorporation in the hair shaft because of the different related lipophilicity. Longer chains showing higher lipophilicity might enhance the transfer to hair. Further, the hydrolysis of parabens by human microsomes occurs more rapidly for methylparaben and the rate decreases with increasing carbon chain length (Abbas et al. 2010), likely providing less time for MeP to be incorporated into hair arguing for contact time as a contributor to the incorporation of pollutants into the hair in addition to concentration (Chata et al. 2016; Faÿs et al. 2023; Junaid et al. 2024). Finally, MeP is the most abundant paraben found in food, either occurring naturally such like in cloudberry, yellow passion fruit juice, white wine, vanilla, or added as preservatives in processed food like cakes, pastries, icings, toppings and fillings, or soft drinks (Soni,

Carabin, and Burdock 2005), thus involving an additional exposure pathway besides dermal absorption. This latter assumption may be weakened by significant correlations observed between parabens in each matrix.

A last point arguing to the detriment of the hair use is the occurrence of some outlier concentrations in MeP measured in hair, more than 120-fold higher than the interquartile range (IQ) whereas urine levels are less spread. These extreme outlier values might arise from an external contamination due the participant's use of hair wax or other hair products containing MeP, which were not entirely removed despite the successive washing steps prior to hair analysis (Claessens, Pirard, and Charlier 2022).

Limitations of the study

The main limitation of this study was the small size and non-representativeness of the population selected, thus reducing the statistical power of the obtained results. Nevertheless, the pollutant levels measured across the matrices were similar to those reported from recent larger scale studies carried out on similar populations, validating the design of the present study and the selection of cutoff values for the Cohen's kappa determination. In addition, this study also suffers from the known limitations inherent in the matrices tested. Single spot urine samples were found to not reliably reflect exposure to some non-persistent compounds due to a high intra-individual level variability (Dewalque et al. 2015; Roggeman et al. 2022), but the collection of multiple samples or 24-hour urine samples might not significantly reduce this variability (Faÿs et al. 2021; Lassen et al. 2013). The (1) difficulty to differentiate endogenous from exogenous contaminations, (2) lack of standardized decontamination procedure and (3) limited availability of commercial quality controls diminish the usefulness of the use of hair markers (Claessens, Pirard, and Charlier 2022; Junaid et al. 2024). Nonetheless, urine spot sample remains the most used matrix for the biomonitoring of chemicals such as bisphenols and parabens (Vorkamp et al. 2021), and hair is undoubtedly one of the promising alternative

matrices due to its non-invasiveness nature and the lower concentration variability for non-persistent compounds compared to urine (Faÿs et al. 2021). Therefore, since this investigation was intended to knowingly select matrices to be used within an epidemiological study, considering the information provided and the current advantages and disadvantages, these limitations are an integral part of the study.

Conclusions

This short preliminary study provides valuable data on the levels and distributions of several persistent (8 PFAS and 6 PCBs) and non-persistent pollutants (three parabens and two bisphenols) in paired serum and hair samples or paired spot urine and hair samples from 30 Belgian non-occupationally exposed individuals. The results were expected to help in the selection of the most suitable markers (and thus the most appropriate matrix) to be measured in an upcoming epidemiological study to assess the relationship between chemical exposure and diabetes.

When investigating the distribution of chemicals between the reference (serum or urine) and the alternative (hair) matrices, the first and main takeaway is that the conclusions are different according to the chemical group and even according to the targeted chemical within the same group. For PFAS, despite the invasiveness of the sampling, serum still appears to be the most suitable matrix compared to hair. This results from the low concentrations observed in hair compared to serum, resulting in a high proportion of non-detected measurements in hair samples. In addition, the unknown mechanism of incorporation into hair, the potential role of keratin and plasma proteins in PFAS distribution, the higher representativeness of internal exposure in serum compared to hair (due to the difficulty in discerning internal and external contamination of hair), and the large amount of data available on PFAS serum levels support this option. PCB results in serum and hair seemed to lead to similar interpretations for higher chlorinated congeners, while lower chlorinated ones seemed to be in higher

proportion in hair and mainly undetected in serum. Data suggest hair as the preferred matrix for PCB measurement, if external contamination might be undoubtedly be excluded. For bisphenols, hair and urine levels provided different information. The classification of the levels measured in both matrices varied markedly, therefore making the selection of the matrix strongly influential on the association evaluation between exposure and health outcomes. Further, BPA and BPS seemed to behave differently during their incorporation in the hair shaft, further complicating the selection of the matrix. Finally for parabens, even if differences occurred regarding the carbon chain length of the paraben, hair or urine seemed to show similar reliability in exposure assessment. Nevertheless, a highly performant decontamination procedure needs to be performed to ensure the absence of external contamination for these chemicals used in hair care products.

The selection of markers and the human matrix to be sampled within the design of a biomonitoring or epidemiological study is both complex and critical, as it can significantly bias the results when studying health risks related to chemical exposure assessed from chemical levels in biological matrices. Further research is needed to better understand the distribution of chemicals in human biological matrices, including the mechanisms underlying the incorporation of chemicals into alternative matrices such as hair. In addition, efforts need to focus on addressing the limitations inherent to each matrix such as (1) distinguishing external from internal hair contamination (2), improving the reliability of urinary results, and (3) reducing the invasiveness of sampling procedures.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

ORCIDJulien Claessens  <http://orcid.org/0000-0003-3758-1980>**Data availability statement**

Data will be made available on reasonable request.

Abbreviations

HBM	Human biomonitoring
POPs	Persistent organic pollutants
PFAS	Perfluoroalkyl substances
PCBs	Polychlorobiphenyls
PFPeA	Perfluoropentanoic acid
PFHxA	Perfluorohexanoic acid
PFHpA	Perfluoroheptanoic acid
PFOA	Perfluorooctanoic acid
PFNA	Perfluorononanoic acid
PFDA	Perfluorodecanoic acid
PFHxS	Perfluorohexanesulfonate
PFOS	Linear perfluorooctanesulfonate
MeOH	Methanol
UHPLC	Ultra-high performance liquid chromatography
MS/MS	Tandem mass spectrometer
LOQ	Limit of quantification
GC	Gas chromatography
MeP	Methylparaben
EtP	Ethylparaben
PrP	Propylparaben
DF	Detection frequency
ICC	Intraclass correlation coefficient
GM	Geometric mean
P25	Percentile 25
P50	Percentile 50
P75	Percentile 75
P95	Percentile 95
Min-max:	Minimum-maximum
CI	Confidence interval

References

- Abbas, S., H. Greige-Gerges, N. Karam, M. H. Piet, P. Netter, and J. Magdalou. 2010. "Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 25 (6): 568–577. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-013>.
- Alves, A., A. Kucharska, C. Erratico, F. Xu, E. Den Hond, G. Koppen, G. Vanermen, A. Covaci, and S. Voorspoels. 2014. "Human Biomonitoring of Emerging Pollutants Through Non-Invasive Matrices: State of the Art and Future Potential." *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 406 (17): 4063–4088. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7748-1>.
- Appenzeller, B. M. R. 2015. "Hair Analysis for the Biomonitoring of Human Exposure to Inorganic Pollutants." In *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801700-5.00007-8>.
- Appenzeller, B. M. R., and A. M. Tsatsakis. 2012. "Hair Analysis for Biomonitoring of Environmental and Occupational Exposure to Organic Pollutants: State of the Art, Critical Review and Future Needs." *Toxicology Letters* 210 (2): 119–140. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.10.021>.
- Balestier, A., C. Fillol, J. Gane, A. Oleko, A. Saoudi, and A. Zeghnoun. 2021. "Imprégnation de la population française chez les adultes par les PCB, dioxines et furanes Programme national de biosurveillance, Esteban 2014–2016." *Saint-Maurice : Santé publique France*, 148 p. www.santepubliquefrance.fr.
- Barmpas, M., E. Vakonaki, M. Tzatzarakis, S. Sifakis, A. Alegakis, T. Grigoriadis, D. B. Sodré, G. Daskalakis, A. Antsaklis, and A. Tsatsakis. 2020. "Organochlorine pollutants' Levels in Hair, Amniotic Fluid and Serum Samples of Pregnant Women in Greece. A Cohort Study." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 73:103279. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103279>.
- Braun, J. M., K. W. Smith, P. L. Williams, A. M. Calafat, K. Berry, S. Ehrlich, and R. Hauser. 2012. "Variability of Urinary Phthalate Metabolite and Bisphenol a Concentrations Before and During Pregnancy." *Environmental Health Perspectives* 120 (5): 739–745. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104139>.
- Bro, R., and A. K. Smilde. 2003. "Centering and Scaling in Component Analysis." *Journal of Chemometrics* 17 (1): 16–33. <https://doi.org/10.1002/cem.773>.
- Calafat, A. M., M. P. Longnecker, M. K. Holger, H. S. Shanna, H. Russ, R. G. Lynn, P. L. Bruce, et al. 2016. "Response to 'Comment on 'Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology'.'" *Environmental Health Perspectives* 124 (4): A66. <https://doi.org/10.1289/ehp.1611282>.
- Cao, X., R. Qin, S. Zhang, W. Luo, J. Qin, X. Yan, F. Cai, Q. Liao, Y. Yu, and J. Zheng. 2024. "Bisphenol Pollutants Bind with Human Hair Keratin: Combining Evidence from Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking." *Science of the Total Environment* 957:177533. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177533>.
- Carnevale, A., K. Aleksa, C. G. Goodyer, and G. Koren. 2014. "Investigating the Use of Hair to Assess Polybrominated Diphenyl Ether Exposure Retrospectively." *Therapeutic Drug Monitoring* 36 (2): 244–251. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318a69a8b>.
- Chata, C. M., E. Hardy, N. Grova, and B. M. R. Appenzeller. 2016. "Influence of Pesticide Physicochemical Properties on the Association Between Plasma and Hair Concentration." *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 408 (13): 3601–3612. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9442-y>.

- Cirello, V., M. Lugaresi, C. Moneta, P. Dufour, A. Manzo, E. Carbone, C. Colombo, L. Fugazzola, C. Charlier, and C. Pirard. 2024. "Thyroid Cancer and Endocrine Disruptive Chemicals: A Case-Control Study on Per-Fluoroalkyl Substances and Other Persistent Organic Pollutants." *European Thyroid Journal* 13 (3): e230192. <https://doi.org/10.1530/ETJ-23-0192>.
- Claessens, J., C. Pirard, and C. Charlier. 2022. "Determination of Contamination Levels for Multiple Endocrine Disruptors in Hair from a Non-Occupationally Exposed Population Living in Liege (Belgium)." *Science of the Total Environment* 815:152734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152734>.
- Colles, A., L. Bruckers, E. Den Hond, E. Govarts, B. Morrens, T. Schettgen, J. Buekers, et al. 2020. "Perfluorinated Substances in the Flemish Population (Belgium): Levels and Determinants of Variability in Exposure." *Chemosphere* 242:125250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125250>.
- Cone, E. J. 1996. "Mechanisms of Drug Incorporation into Hair." *Therapeutic Drug Monitoring* 18 (4): 438–443. <https://doi.org/10.1097/00007691-199608000-00022>.
- Dekant, W., and W. Volkel. 2008. "Human Exposure to Bisphenol a by Biomonitoring: Methods, Results and Assessment of Environmental Exposures." *Toxicology & Applied Pharmacology* 228 (1): 114–134. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.008>.
- De Silva, A. O., J. M. Armitage, T. A. Bruton, C. Dassuncao, W. Heiger-Bernays, X. C. Hu, A. Kärrman, et al. 2021. "PFAS Exposure Pathways for Humans and Wildlife: A Synthesis of Current Knowledge and Key Gaps in Understanding." *Environmental Toxicology and Chemistry* 40 (3): 631–657. <https://doi.org/10.1002/etc.4935>.
- Dewalque, L., C. Pirard, N. Dubois, and C. Charlier. 2014. "Simultaneous Determination of Some Phthalate Metabolites, Parabens and Benzophenone-3 in Urine by Ultra-High Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography B* 949-950:37–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.002>.
- Dewalque, L., C. N. Pirard, and C. Charlier. 2014. "Measurement of Urinary Biomarkers of Parabens, Benzophenone-3, and Phthalates in a Belgian Population." *Biomed Research International* 2014:1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/649314>.
- Dewalque, L., C. Pirard, S. Vandepaer, and C. Charlier. 2015. "Temporal Variability of Urinary Concentrations of Phthalate Metabolites, Parabens and Benzophenone-3 in a Belgian Adult Population." *Environmental Research* 142:414–423. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.07.015>.
- Dufour, P., C. Pirard, M. C. Seghaye, and C. Charlier. 2018. "Association Between Organohalogenated Pollutants in Cord Blood and Thyroid Function in Newborns and Mothers from Belgian Population." *Environmental Pollution* 238:389–396. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.058>.
- Engel, L. S., J. P. Buckley, G. Yang, L. M. Liao, J. Satagopan, A. M. Calafat, C. E. Matthews, et al. 2014. "Predictors and Variability of Repeat Measurements of Urinary Phenols and Parabens in a Cohort of Shanghai Women and Men." *Environmental Health Perspectives* 122 (7): 733–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306830>.
- EU. 1996. "Council Directive 96/59/EC of 16 September 1996 on the Disposal of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Terphenyls (PCB/PCT)."
- Faÿs, F., E. M. Hardy, P. Palazzi, S. Haan, C. Beausoleil, and B. M. R. Appenzeller. 2021. "Biomonitoring of Fast-Elimination Endocrine Disruptors – Results from a 6-Month Follow Up on Human Volunteers with Repeated Urine and Hair Collection." *Science of the Total Environment* 778:146330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146330>.
- Faÿs, F., P. Palazzi, F. Zeman, E. M. Hardy, C. Schaeffer, C. Rousselle, C. Beausoleil, and B. M. R. Appenzeller. 2023. "Incorporation of Fast-Elimination Chemicals in Hair is Governed by Pharmacokinetics–Implications for Exposure Assessment." *Environmental Science & Technology* 57 (19): 7336–7345. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06777>.
- Fillol, C., A. Oleko, A. Saoudi, A. Zeghnoun, A. Balicco, J. Gane, L. Rambaud, et al. 2021. "Exposure of the French Population to Bisphenols, Phthalates, Parabens, Glycol Ethers, Brominated Flame Retardants, and Perfluorinated Compounds in 2014–2016: Results from the Esteban Study." *Environment International* 147:106340. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106340>.
- Fischer, F. C., S. Ludtke, C. Thackray, H. M. Pickard, F. Haque, C. Dassuncao, S. Endo, L. Schaider, and E. M. Sunderland. 2024. "Binding of Per-And Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) to Serum Proteins: Implications for Toxicokinetics in Humans." *Environmental Science & Technology* 58 (2): 1055–1063. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c07415>.
- Genuis, S. J., S. Beesoon, and D. Birkholz. 2013. "Biomonitoring and Elimination of Perfluorinated Compounds and Polychlorinated Biphenyls Through Perspiration: Blood, Urine, and Sweat Study." *ISRN Toxicology* 2013:1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/483832>.
- Glüge, J., M. Scheringer, I. T. Cousins, J. C. DeWitt, G. Goldenman, D. Herzke, R. Lohmann, C. A. Ng, X. Trier, and Z. Wang. 2020. "An Overview of the Uses of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS)." *Environmental Science Processes & Impacts* 22 (12): 2345–2373. <https://doi.org/10.1039/d0em00291g>.
- Göckener, B., T. Weber, H. Rüdel, M. Bücking, and M. Kolossa-Gehring. 2020. "Human Biomonitoring of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in German Blood Plasma Samples from 1982 to 2019." *Environment International* 145:106123. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106123>.
- Hardy, E. M., C. Dereumeaux, L. Guldner, O. Briand, S. Vandentorren, A. Oleko, C. Zaros, and B. M. R. Appenzeller. 2021. "Hair versus Urine for the Biomonitoring of Pesticide Exposure: Results from a Pilot Cohort Study on Pregnant Women." *Environment*

- International* 152:106481. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106481>.
- Hernández, A. F., D. Lozano-Paniagua, B. González-Alzaga, M. P. Kavvalakis, M. N. Tzatzarakis, I. López-Flores, C. Aguilar-Garduño, R. A. Caparros-Gonzalez, A. M. Tsatsakis, and M. Lacasaña. 2019. "Biomonitoring of Common Organophosphate Metabolites in Hair and Urine of Children from an Agricultural Community." *Environment International* 131:104997. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104997>.
- Hsu, J.-F., W. Chih-Wei Chang, W.-Y. Ho, and P.-C. Liao. 2022. "Exploration of Long-Term Exposure Markers for Phthalate Esters in Human Hair Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 1200:339610. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339610>.
- Iglesias-González, A., E. M. Hardy, and B. M. R. Appenzeller. 2020. "Cumulative Exposure to Organic Pollutants of French Children Assessed by Hair Analysis." *Environment International* 134:105332. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105332>.
- Janjua, N. R., H. Frederiksen, N. E. Skakkebæk, H. C. Wulf, and A. M. Andersson. 2008. "Urinary Excretion of Phthalates and Paraben After Repeated Whole-Body Topical Application in Humans." *International Journal of Andrology* 31 (2): 118–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00841.x>.
- Jian, J. M., D. Chen, F.-J. Han, Y. Guo, L. Zeng, X. Lu, and F. Wang. 2018. "A Short Review on Human Exposure to and Tissue Distribution of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)." *Science of the Total Environment* 636:1058–1069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.380>.
- Junaid, M., M. Sultan, S. Liu, N. Hamid, Q. Yue, D. S. Pei, J. Wang, and B. M. R. Appenzeller. 2024. "A Meta-Analysis Highlighting the Increasing Relevance of the Hair Matrix in Exposure Assessment to Organic Pollutants." *Science of the Total Environment* 917:170535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170535>.
- Kim, D. H., J. H. Lee, and J. E. Oh. 2019. "Perfluoroalkyl Acids in Paired Serum, Urine, and Hair Samples: Correlations with Demographic Factors and Dietary Habits." *Environmental Pollution* 248:175–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.017>.
- Knutsen, H. K., J. Alexander, L. Barregård, M. Bignami, B. Brüschweiler, S. Ceccatelli, B. Cottrill, et al. 2018. "Risk to Human Health Related to the Presence of Perfluoroctane Sulfonic Acid and Perfluorooctanoic Acid in Food." *EFSA Journal* 16 (12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5194>.
- Koo, T. K., and M. Y. Li. 2016. "A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research." *Journal of Chiropractic Medicine* 15 (2): 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>.
- LaKind, J. S., F. Idri, D. Q. Naiman, and M. A. Verner. 2019. "Biomonitoring and Nonpersistent Chemicals—Understanding and Addressing Variability and Exposure Misclassification." *Current Environmental Health Reports* 6 (1): 16–21. <https://doi.org/10.1007/s40572-019-0227-2>.
- Lallmahomed, A., F. Mercier, N. Costet, C. Fillol, N. Bonvallot, and B. Le Bot. 2024. "Characterization of Organic Contaminants in Hair for Biomonitoring Purposes." *Environment International* 183:108419. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108419>.
- Lassen, T. H., H. Frederiksen, T. K. Jensen, J. H. Petersen, K. M. Main, N. E. Skakkebæk, N. Jørgensen, et al. 2013. "Temporal Variability in Urinary Excretion of Bisphenol a and Seven Other Phenols in Spot, Morning, and 24-H Urine Samples." *Environmental Research* 126:164–170. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.07.001>.
- Li, J., F. Guo, Y. Wang, J. Zhang, Y. Zhong, Y. Zhao, and Y. Wu. 2013. "Can Nail, Hair and Urine Be Used for Biomonitoring of Human Exposure to Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid?" *Environment International* 53:47–52. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.002>.
- Li, N., G.-G. Ying, H. Hong, E. Po Keung Tsang, and W.-J. Deng. 2021. "Plasticizer Contamination in the Urine and Hair of Preschool Children, Airborne Particles in Kindergartens, and Drinking Water in Hong Kong." *Environmental Pollution* 271:116394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116394>.
- Liu, B., R. Zhang, H. Zhang, Y. Yu, D. Yao, and S. Yin. 2020. "Levels of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in Human Serum, Hair and Nails in Guangdong Province, China: Implications for Exploring the Ideal Bio-Indicator." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 79 (2): 184–194. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00743-w>.
- Ma, Y., H. Liu, J. Wu, L. Yuan, Y. Wang, X. Du, R. Wang, et al. 2019. "The Adverse Health Effects of Bisphenol a and Related Toxicity Mechanisms." *Environmental Research* 176:108575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>.
- Martín, J., J. L. Santos, I. Aparicio, and E. Alonso. 2019. "Exposure Assessment to Parabens, Bisphenol a and Perfluoroalkyl Compounds in Children, Women and Men by Hair Analysis." *Science of the Total Environment* 695:133864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133864>.
- McHugh, M. L. 2012. "Lessons in Biostatistics Interrater Reliability: The Kappa Statistic." *Biochimia Medica* 22:276–282. <https://doi.org/10.11613/BM.2012.031>.
- Naidu, R., B. Biswas, I. R. Willett, J. Cribb, B. Kumar Singh, C. Paul Nathanail, F. Coulon, et al. 2021. "Chemical Pollution: A Growing Peril and Potential Catastrophic Risk to Humanity." *Environment International* 156:106616. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106616>.
- Peng, F. J., C. Emond, E. M. Hardy, N. Sauvageot, A. Alkerwi, M. L. Lair, and B. M. R. Appenzeller. 2021. "Population-Based Biomonitoring of Exposure to Persistent and Non-Persistent Organic Pollutants in the Grand Duchy of Luxembourg: Results from Hair Analysis." *Environment International* 153:106526. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106526>.

- Peng, F. J., E. M. Hardy, R. Béranger, S. Mezzache, N. Bourokba, P. Bastien, J. Li, et al. 2020. "Human Exposure to PCBs, PBDEs and Bisphenols Revealed by Hair Analysis: A Comparison Between Two Adult Female Populations in China and France." *Environmental Pollution* 267:115425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115425>.
- Philippat, C., D. Bennett, A. M. Calafat, and I. H. Picciotto. 2015. "Exposure to Select Phthalates and Phenols Through Use of Personal Care Products Among Californian Adults and Their Children." *Environmental Research* 140:369–376. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.009>.
- Pirard, C., and C. Charlier. 2022. "Urinary Levels of Parabens, Phthalate Metabolites, Bisphenol a and Plasticizer Alternatives in a Belgian Population: Time Trend or Impact of an Awareness Campaign?" *Environmental Research* 214:113852. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113852>.
- Pirard, C., S. Compere, K. Firquet, and C. Charlier. 2018. "The Current Environmental Levels of Endocrine Disruptors (Mercury, Cadmium, Organochlorine Pesticides and PCBs) in a Belgian Adult Population and Their Predictors of Exposure." *International Journal of Hygiene & Environmental Health* 221 (2): 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.010>.
- Pirard, C., P. Dufour, and C. Charlier. 2020. "Background Contamination of Perfluoroalkyl Substances in a Belgian General Population." *Toxicology Letters* 333:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.015>.
- Roggeman, M., C. Gys, A. Klimowska, M. Bastiaensen, B. Wielgomas, A. B. Yu, and A. Covaci. 2022. "Reviewing the Variability in Urinary Concentrations of Non-Persistent Organic Chemicals: Evaluation Across Classes, Sampling Strategies and Dilution Corrections." *Environmental Research* 215:114332. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114332>.
- Sanchis, Y., C. Coscollà, F. Corpas-Burgos, M. Vento, M. Gormaz, and V. Yusà. 2020. "Biomonitoring of Bisphenols A, F, S and Parabens in Urine of Breastfeeding Mothers: Exposure and Risk Assessment." *Environmental Research* 185:109481. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109481>.
- Schettgen, T., A. Alt, A. Esser, and T. Kraus. 2015. "Current Data on the Background Burden to the Persistent Organochlorine Pollutants HCB, p,p'-DDE as Well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in Plasma of the General Population in Germany." *International Journal of Hygiene & Environmental Health* 218 (4): 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.006>.
- Schramm, K. W. 2008. "Hair-Biomonitoring of Organic Pollutants." *Chemosphere* 72 (8): 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.017>.
- Shilnikova, N., F. Momoli, N. Karyakina, and D. Krewski. 2025. "Review of Non-Invasive Biomarkers as a Tool for Exposure Characterization in Human Health Risk Assessments." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 28 (2): 122–150. <https://doi.org/10.1080/10937404.2024.2428206>.
- Soni, M. G., I. G. Carabin, and G. A. Burdock. 2005. "Safety Assessment of Esters of P-Hydroxybenzoic Acid (Parabens)." *Food & Chemical Toxicology* 43 (7): 985–1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>.
- Sun, Q., G. Zong, D. Valvi, F. Nielsen, B. Coull, and P. Grandjean. 2018. "Plasma Concentrations of Perfluoroalkyl Substances and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Investigation Among U.S. Women." *Environmental Health Perspectives* 126 (3): 1–10. <https://doi.org/10.1289/EHP2619>.
- Tian, X., K. Huang, Y. Liu, K. Jiang, R. Liu, J. Cui, F. Wang, et al. 2023. "Distribution of Phthalate Metabolites, Benzophenone-Type Ultraviolet Filters, Parabens, Triclosan and Triclocarban in Paired Human Hair, Nail and Urine Samples." *Environmental Pollution* 333:122083. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122083>.
- UNEP. 2019. "Global Chemicals Outlook II: From Legacies to Innovative Solutions."
- Vorkamp, K., A. Castaño, J. P. Antignac, L. D. Boada, E. Cequier, A. Covaci, M. Esteban López, et al. 2021. "Biomarkers, Matrices and Analytical Methods Targeting Human Exposure to Chemicals Selected for a European Human Biomonitoring Initiative." *Environment International* 146:106082. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106082>.
- Wang, Y., Y. Zhong, J. Li, J. Zhang, B. Lyu, Y. Zhao, and Y. Wu. 2018. "Occurrence of Perfluoroalkyl Substances in Matched Human Serum, Urine, Hair and Nail." *Journal of Environmental Sciences* 67:191–197. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.017>.
- Wojtkiewicz, J., M. Tzatzarakis, E. Vakonaki, K. Makowska, and S. Gonkowski. 2021. "Evaluation of Human Exposure to Parabens in Northeastern Poland Through Hair Sample Analysis." *Scientific Reports* 11 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03152-8>.
- Zheng, G., S. M. Eick, and A. Salamova. 2023. "Elevated Levels of Ultrashort- and Short-Chain Perfluoroalkyl Acids in US Homes and People." *Environmental Science & Technology* 57 (42): 15782. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06715>.
- Zheng, J., L.-H. Yu, S.-J. Chen, G.-C. Hu, K.-H. Chen, X. Yan, X.-J. Luo, et al. 2016. "Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Human Hair and Serum from E-Waste Recycling Workers in Southern China: Concentrations, Chiral Signatures, Correlations, and Source Identification." *Environmental Science & Technology* 50 (3): 1579–1586. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04955>.

Chapitre 4. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET DIABÈTE DE TYPE 2, ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE EN POPULATION LIÉGEOISE

4.1 Introduction

Comme cela a été discuté dans les chapitres 1.3 et 1.4, et dans la publication 1, le DT2 est une pathologie épidémique à travers le monde et les études menées en laboratoire, qu'elles soient *in vitro* ou *in vivo* sont de plus en plus nombreuses à montrer le caractère diabétogène de certains polluants. Actuellement, les données épidémiologiques ne permettent pas de démontrer le lien entre la contamination de l'Homme par ces polluants et la pathologie. En effet, les données sont parfois contradictoires, certaines études rapportant des associations alors que d'autres non (132,147,180).

Il faut néanmoins s'abstenir de conclure trop hâtivement face à cette absence de consensus dans les études épidémiologiques. En effet, la réalisation de celles-ci se heurte à de nombreuses difficultés qui peuvent biaiser ou masquer certains résultats. Nous avons, par exemple, déjà mentionné plus tôt dans cette thèse, la difficulté du choix de la matrice biologique adaptée pour évaluer l'exposition d'un individu à un polluant. Les études réalisées sur le cheveu ont permis d'améliorer nos connaissances sur les différentes matrices ainsi que sur leurs avantages et leurs limites. Ainsi, il semble que le sérum soit la meilleure matrice pour le monitoring des polluants persistants. Pour les polluants non persistants, en l'absence de solutions pour pallier les limites de la matrice cheveux, l'urine demeure la matrice privilégiée à nos yeux. Si nos études sur le cheveu semblent ouvrir de nouveaux horizons pour le biomonitoring des polluants environnementaux, les résultats des corrélations entre les matrices, l'absence de contrôles qualités commerciaux et le problème de la contamination externe outrepassent les bénéfices que cette matrice peut offrir, comme l'effet mémoire ou la facilité de prélèvement. La variabilité intra-individuelle des concentrations de certains polluants chimiques dans l'urine peut être en partie diminuée par la taille de la population et par l'utilisation de méthodes d'ajustement des concentrations urinaires des polluants (164). Ainsi, pour étudier l'impact des perturbateurs endocriniens sur une population, il nous apparaît légitime de mesurer les niveaux de contamination dans les échantillons sériques et urinaires.

Après le choix de la matrice biologique, la façon d'ajuster les concentrations mesurées dans cette matrice peut également avoir un impact significatif sur les résultats d'une étude. En effet, pour de nombreux auteurs, rapporter ces concentrations en masse par volume n'est pas la façon optimale de procéder (181). Ainsi dans la plupart des études épidémiologiques, les

concentrations volumétriques sont ajustées, mais les méthodes d'ajustement employées sont nombreuses ce qui ajoute de la variabilité entre les études. Ces ajustements sont néanmoins indispensables. En effet, pour les polluants urinaires, la concentration du composé dans l'échantillon d'urine dépend de la dilution de celle-ci qui, elle-même, dépend de l'état d'hydratation de l'individu. Ce paramètre varie fortement en cours d'une même journée chez un même individu, cette variabilité va donc se répercuter sur les concentrations des xénobiotiques urinaires. Et cela va avoir un impact négatif sur la puissance statistique des études épidémiologiques explorant les polluants urinaires, certains résultats pouvant ainsi être masqués. Plusieurs paramètres, à savoir, l'ajustement par la gravité spécifique urinaire, par l'osmolalité urinaire ou par la concentration de l'échantillon en créatinine, peuvent permettre de tenir compte de la dilution de l'urine au moment du prélèvement. Le plus souvent, les auteurs pondèrent en divisant simplement la concentration volumique du polluant par la concentration urinaire de la créatinine. Cette méthode repose sur l'hypothèse que l'élimination de la créatinine est constante au cours du temps. Cependant, cette hypothèse n'est pas toujours vraie, notamment si des facteurs peuvent être en relation à la fois avec les niveaux de polluants, les niveaux de créatinine et la pathologie observée (par exemple : l'altération de la fonction rénale chez les diabétiques). Des alternatives sont ainsi décrites dans la littérature, certains préconisant l'introduction des paramètres de correction comme covariables dans les modèles statistiques ou l'utilisation d'une méthode d'ajustement de la concentration statistiquement pondérée (181–183).

De la même manière, les polluants sériques lipophiles sont généralement corrigés par la concentration sérique des lipides totaux car les individus avec un niveau de lipides sériques plus élevé ont tendance à transporter plus de polluants lipophiles dans leur sérum. La correction par les lipides totaux permet également de refléter la concentration des polluants lipophiles dans les compartiments graisseux de l'organisme dans lesquels ils se stockent, ainsi que de standardiser les concentrations en fonction de la variation des lipides totaux sériques au cours du temps (163,182,184). Comme pour les polluants urinaires, les polluants lipophiles sériques sont le plus souvent pondérés en divisant leurs concentrations par la valeur des lipides totaux sériques. Cependant, certains auteurs suggèrent que cette approche, pouvant être influencée par des paramètres (IMC, âge, ...) directement en lien avec des pathologies

métaboliques telles que le DT2 n'est pas toujours adaptée lors d'études épidémiologiques (182,183,185).

Dans notre étude, nous avons testé plusieurs méthodes de pondération des dosages. Premièrement, nous avons réalisé des modèles statistiques en utilisant les concentrations volumétriques des polluants. Deuxièmement, les valeurs de créatinine ou des lipides totaux ont été introduites dans les modèles statistiques comme covariables. Troisièmement, nous avons appliqué le modèle classique de division de la concentration des polluants par les facteurs de correction. Enfin, le dernier modèle testé est un modèle d'ajustement statistiquement pondérée : la « covariate-adjusted standardization » (CAS). En résumé, pour les polluants urinaires, une valeur théorique de créatinine est prédite pour chaque individu au moyen d'un modèle de régression linéaire. La concentration des polluants est ensuite multipliée par un ratio entre cette créatinine théorique et la créatinine mesurée. Le même protocole a été appliqué aux polluants lipophiles avec les lipides totaux sériques (182).

Un autre paramètre pouvant expliquer en partie les discordances entre les différentes études est la difficulté de prendre en compte « l'effet cocktail », notion que nous avons expliquée en introduction de cette thèse. Ces dernières années, les connaissances et les réglementations ont évolué en prenant en compte l'exposition aux mélanges de substances et non plus uniquement en considérant les composés individuellement. En effet, il est aujourd'hui bien établi que les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets additifs, antagonistes ou synergiques (186). De plus en plus d'études épidémiologiques s'intéressent donc à l'évaluation de cet effet cocktail en explorant l'impact d'un mélange de polluants, par exemple sur l'altération de la fonction thyroïdienne ou encore sur la survenue cancers ou de troubles du neurodéveloppement (159,160,187). Si l'exposition en laboratoire de cellules ou d'animaux à des cocktails de contaminants pour en étudier l'impact sur l'homéostasie glucidique est facilement réalisable (188), il est en revanche beaucoup plus compliqué d'en étudier l'impact chez l'Humain, notamment à travers les études épidémiologiques. A ce jour, les données liant la coexposition à de multiples substances et le DT2 chez l'Homme sont rares et seules quelques études ont approché l'analyse des effets cocktails (189–191). Il est donc nécessaire d'étudier l'impact de l'exposition simultanée à de multiples polluants sur le DT2.

Pour ce faire, nous devons utiliser des méthodes statistiques plus adaptées. Ces méthodes doivent idéalement pouvoir intégrer un grand nombre de covariables sans perte de puissance

statistique. La corrélation entre les concentrations de différents polluants mesurées dans notre population rend les modèles de régression multiples classiques inadaptés (186). Différentes méthodes ont été proposées dans la littérature pour évaluer l'impact de la coexposition à différents polluants (192). Les options que nous avons choisies dans ce travail pour étudier l'effet cocktail sont, d'une part, la « Weighted Quantile Sum (WQS) regression » et, d'autre part, la méthode bayésienne « Bayesian Kernel machine regression » (BKMR).

La méthodologie WQS permet de mettre en évidence des associations monotones entre l'exposition à un mélange de polluants et un effet sur la santé. Cette méthode permet également d'identifier au sein du mélange de polluants quels composés sont les plus fortement associés à l'effet étudié. Malheureusement, la méthodologie WQS ne permet pas de mettre en évidence des relations non linéaires ou non additives entre les polluants (160,193,194). Le modèle BKMR permet de répondre à ces lacunes. Même s'il est plus difficile à modéliser et interpréter, le modèle BKMR possède l'avantage non seulement de mettre en évidence un effet non monotone d'un mélange de substances sur une variable dépendante, d'identifier parmi ce mélange quelles substances sont les plus problématiques mais également de mettre en évidence des interactions non additives entre les différents polluants (195).

Dans ce travail, l'influence des PE sur le DT2 a été étudiée au moyen d'une étude transversale durant laquelle les niveaux de contamination pour différentes familles de PE ont été étudiés chez 105 individus diabétiques de type 2 et comparés aux niveaux observés chez 98 volontaires sains. Différentes familles de polluants ont été incluses dans l'étude. Des bisphénols, phtalates, parabènes, métabolites de OP ainsi que le TCS et la BP-3 ont été mesurés dans l'urine. Dans le sérum, les concentrations de plusieurs PCB, du 4,4'-DDE, ainsi que celles de différents PFAS ont été déterminées.

Le lien entre la contamination par les différents composés mesurés dans l'étude et le DT2 a été évalué en utilisant différentes méthodes statistiques. Premièrement, de façon monovariée puis multivariée avec une approche monopolluant, ensuite, le lien entre la contamination et la pathologie a été étudié en considérant l'effet cocktail.

L'objectif de ce travail est donc triple :

- Étudier les éventuelles associations entre l'exposition à plusieurs familles de polluants et le DT2 ;

- Explorer comment la correction des concentrations par les lipides et la créatinine peut impacter ces associations ;
- Aller au-delà des modèles monopolluants en employant des méthodes statistiques adaptées à la prise en considération de plusieurs polluants simultanément et donc à l'investigation de l'effet cocktail ;

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 Population de l'étude

Entre 2021 et 2022, 105 patients diabétiques ont été recrutés lors d'une hospitalisation ou d'une visite de contrôle au sein du service de Diabétologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Liège. Parallèlement, 98 volontaires sains ont été recrutés dans une population de donneurs de sang se rendant aux collectes mobiles organisées par la Croix-Rouge en Province de Liège ainsi que parmi le personnel de l'Université et du CHU de Liège. Dans la mesure du possible, ces derniers ont été sélectionnés de manière à correspondre en âge et en sexe aux volontaires diabétiques. Cette étude a été autorisée par le Comité d'Ethique hospitalo-facultaire du CHU-ULiège (n°2016-296).

Chaque volontaire s'est soumis à un prélèvement sanguin effectué par le personnel du centre de prélèvement de l'hôpital. Deux tubes secs sans gel de 10 mL ont été collectés chez chaque individu, tandis qu'un tube EDTA a été prélevé en plus chez les volontaires sains afin d'y mesurer l'hémoglobine glyquée (HbA1c). Les volontaires ont également fourni un échantillon urinaire collecté dans un pot à urine en polypropylène. Les données démographiques ont été recueillies au moyen d'un questionnaire. Chez les patients diabétiques, la valeur de l'albuminurie et de l'HbA1c ont été extraites du dossier médical informatisé.

Après le prélèvement, les échantillons ont été acheminés au laboratoire de Toxicologie. A la réception des échantillons, le sang a été centrifugé puis décanté afin d'en récupérer le sérum. Les échantillons de sérum et d'urine ont directement été congelés à -20°C jusqu'à analyse.

4.2.2 Analyse des polluants

4.2.2.1 Les composés inclus dans l'étude

Plusieurs types de composés ont été inclus dans l'étude :

Composés mesurés dans les échantillons urinaires

- Bisphénols : bisphénol AF (BPAF), BPF, BPA, bisphénol Z (BPZ), BPS, bisphénol AP (BPAP) ;
- Triclosan ;
- Métabolites des composés organophosphorés : DEP, DMTP, diméthyldithiophosphate (DMDTP), diéthylthiophosphate (DETP), diéthylthiophosphate (DEDTP) ;
- Parabènes : MP, EP, PrP, n-butylparabène (n-BP) ;
- Phtalates et métabolites du bis(7-methyloctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH): monoéthyl phtalate (MEP), mono-n-butyl phtalate (MnBP), mono-iso-butyl phtalate (MiBP), mono-2-éthylhexyl phtalate (MEHP), mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate (5-OH-MEHP), mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate (5-oxo-MEHP), monobenzyl phtalate (MBzP), cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-hydroxy-4-methyl)octyl ester (OH-MINCH), cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-carboxylate-4-méthyl)heptyl ester (cx-MINCH), 7-carboxy-(mono-méthyl-heptyl) phtalate (cx-MiNP), 6-OH-mono-propyl-heptyl phtalate (OH-MiDP) ;
- Benzophénone : BP-3.

Composés mesurés dans les échantillons sériques

- PFAS : PFOA, PFOS total et linéaire, PFHxS, acide perfluoroheptanoïque (PFHpA), acide perfluorohexanoïque (PFHxA), acide perfluorononanoïque (PFNA), acide perfluorodécanoïque (PFDA), acide perfluoroundécanoïque (PFUnDA) ;
- PCB : PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 180 ;
- 4,4'-DDE.

4.2.2.2 Les PFAS dans le sérum

Les PFAS ont été extraits du sérum en suivant la procédure développée précédemment par Dufour et al. (2018) (196). En résumé, 1 mL d'échantillon de sérum est acidifié avec de l'acide

formique avant d'être soumis à une extraction sur phase solide à l'aide de cartouches Oasis WAX (Waters®). L'élution est effectuée par 2×2 mL d'une solution à 2 % de NH₃ dans le méthanol (MeOH). Après évaporation, les extraits sont repris dans 80 µL d'un mélange d'acétate d'ammonium dans l'eau (2 mM) et d'acétonitrile, en proportion 80/20 (v/v). Les échantillons sont ensuite analysés en UHPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS). En plus des échantillons inconnus, chaque séquence comprenait un blanc réactif et deux contrôles de qualité provenant de l'« Arctic Monitoring and Assessment Program » (AMAP) pour polluants persistants organisé par l'Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ).

4.2.2.3 Les PCB et 4,4'-DDE dans le sérum

L'analyse des PCB et du 4,4'-DDE dans le sérum a été effectuée selon la méthode décrite par Cirello et al. (2024) (187). Les échantillons de sérum (1 mL) sont traités avec 0,3 mL d'acide acétique avant d'être soumis à une double extraction liquide-liquide au moyen d'un mélange d'hexane/acétone (95/5 (v/v)). Les phases organiques rassemblées sont ensuite évaporées jusqu'à un volume de 500 µL et éluées sur cartouches PHREE®. Les échantillons sont ensuite concentrés à 50 µL à température ambiante dans des vials comprenant 50 µL de nonane et analysés par chromatographie gazeuse (GC) associée à un détecteur MS/MS. En plus des échantillons inconnus, chaque séquence comprenait un blanc réactif et deux contrôles de qualité provenant de l'AMAP pour polluants persistants organisé par l'INSPQ.

4.2.2.4 Les phtalates, parabènes et benzophénone-3 dans l'urine

L'analyse des phtalates, des parabènes et de la benzophénone-3 dans l'urine se fait par UHPLC-MS/MS (197). En résumé, un aliquot de 3 mL d'échantillon d'urine est extrait en phase solide au moyen d'une cartouche Bond Elut certify LRC, après avoir été hydrolysé à l'aide de β-glucuronidase. En plus des échantillons inconnus, chaque séquence comprenait un blanc réactif et deux contrôles de qualité provenant du « German External Quality Assessment Scheme for Analysis in Biological Materials » (G-EQUAS) ; matériel 9 A/B.

4.2.2.5 Les bisphénols et triclosan dans l'urine

Les bisphénols et le triclosan présents dans les échantillons urinaires ont été analysés selon la méthode précédemment décrite par Pirard et al. (2022) (68). Trois millilitres d'échantillons d'urine sont d'abord hydrolysés en utilisant des enzymes (β-glucuronidase et sulfatase) dans du tampon acétate de sodium à pH 5 pendant 30 minutes à 40°C. L'extraction des composés

d'intérêt est ensuite réalisée par une extraction en phase solide au moyen de cartouche Oasis HLB SPE (Waters®), suivie d'une extraction liquide/liquide effectuée au moyen d'acétate d'éthyle. Avant analyse par GC-MS/MS, les échantillons sont dérivatisés avec du (N-méthyl-N-(triméthylsilyl))trifluoroacétamide. En plus des échantillons inconnus, chaque séquence comprenait un blanc réactif et deux contrôles de qualité, l'un provenant de G-EQUAS (matériel 14/15) et l'autre de « External Quality Assessment Scheme for Organic Substances in Urine » (OSEQUAS) fourni par l'INSPQ.

4.2.2.6 Les métabolites des pesticides organophosphorés dans l'urine

Les métabolites des pesticides organophosphorés (les DAP) ont été analysés en suivant la méthode déjà décrite dans la littérature par Pirard et al. (2020) (110). En résumé, deux étapes sont nécessaires : 3 mL d'échantillon urinaire sont acidifiés par 300 µL d'acide hydrochlorique 3 M et extraits en phase solide sur des cartouches 3cc Oasis WAX (Waters®). L'élution se fait par une solution d'ammoniaque à 5 % dans du méthanol. L'éluât est ensuite évaporé sous flux d'azote à 40°C. Après évaporation, la dérivatisation se fait en ajoutant 1 mL d'acetonitrile, 50 µL de chloroiodopropane et 50 mg de carbonate de potassium. Le mélange est chauffé à 65°C pendant deux heures. Le surnageant est ensuite collecté et évaporé presque à sec à 30°C sous flux d'azote, puis reconstitué dans 70 µL de nonane. L'analyse finale est effectuée par GC-MS/MS. En plus des échantillons inconnus, chaque séquence comprenait un blanc réactif et deux contrôles de qualité provenant de G-EQUAS ; matériel 9 A/B.

4.2.3 Assurance qualité

Les méthodes analytiques ont toutes été validées en accord avec l'approche de l'erreur totale pour atteindre les exigences de la norme ISO 17025 et les guidelines de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (172,198–200). Les LOQ ont été calculées lors des processus de validation et définies comme la plus petite quantité mesurable avec une incertitude maximale sous les 40 %. Toutes les LOQ sont disponibles dans le tableau 2.

4.2.4 Dosage de la créatinine, des lipides totaux et de l'hémoglobine glyquée

La détermination du cholestérol total et des triglycérides a été effectuée au moyen d'un Alinity C (Abbott®, Illinois USA) par deux tests de coloration enzymatique en utilisant les kits Abbott® prévus à cet effet. La valeur des lipides totaux a été calculée à l'aide de la formule de Phillips et al. (1989) (équation 1) (201).

$$\text{lipides totaux} = \text{cholesterol total} \times 2,27 + \text{triglycérides} + 62,3$$

Equation 1 : Formule de Phillips avec : lipides totaux en g/L ; cholestérol total en mg/dL ; triglycérides en mg/dL

Le contenu en créatinine des échantillons urinaires a été déterminé sur un automate Architect ci 4100 (Abbott®, Illinois, USA) en utilisant les réactifs et les kits de calibration fournis par Abbott.

Le dosage de l’HbA1c a été effectué par électrophorèse capillaire sur Capillarys 3 OCTA (Sebia®, Lisses France).

4.2.4.1 Ajustement par la créatinine et les lipides totaux

Comme décrit au point 4.1, plusieurs méthodes d’ajustement des dosages ont été étudiées

- 1) Pas de correction.
- 2) Introduction de la créatinine urinaire ou des lipides totaux comme covariable dans les modèles de régression linéaire.
- 3) Ajustement des concentrations volumétriques par la concentration urinaire de créatinine ou des lipides totaux sériques comme décrit dans les équations 2 et 3.

$$[C_{ua}] = \frac{[Cu]}{[Cr]}$$

Equation 2 : Correction des concentrations urinaires par la créatinine. $[C_{ua}]$: concentration urinaire du polluant ajustée ($\mu\text{g/g}$), $[Cu]$: concentration urinaire du polluant, $[Cr]$: concentration mesurée de la créatinine

$$[C_{sa}] = \frac{[Cs]}{[Lip]}$$

Equation 3 : Correction des concentrations sériques par les lipides totaux. $[C_{sa}]$: concentration sérique du polluant ajustée, $[Cs]$: concentration sérique du polluant, $[Lip]$: concentration des lipides totaux

- 4) Modèle d’ajustement statistique, CAS (182,183) : cette méthode se fait en plusieurs étapes. Tout d’abord, un modèle de régression linéaire est calculé sur base des données de notre population. Ce modèle fait le lien entre, d’une part, la créatinine urinaire (ou les lipides totaux) et d’autre part, l’âge, le sexe et l’IMC. Sur la base de ce modèle, on va ensuite pouvoir calculer pour chaque individu de notre population, une créatinine urinaire (ou un niveau de lipides totaux) théorique que nous nommerons créatinine (ou lipides totaux) prédite.

Ensuite, des ratios sont calculés en divisant la valeur de la créatinine prédite par la valeur de la créatinine mesurée, ou en divisant les lipides totaux prédits par les lipides

totaux mesurés. La concentration des polluants urinaires ou sériques est ensuite ajustée en la multipliant par le ratio correspondant comme décrit dans les équations 4 et 5.

$$[CAS] = [Cu] \times \frac{[pCr]}{[Cr]}$$

Equation 4 : Formule du CAS pour les polluants urinaires. [CAS] : concentration urinaire du polluant ajustée, [Cu] : concentration urinaire du polluant, [pCr] : créatinine prédicté, [Cr] : concentration mesurée de la créatinine

$$[CAS] = [Cs] \times \frac{[pLip]}{[Lip]}$$

Equation 5 : Formule du CAS pour les polluants sériques. [CAS] : concentration sérique du polluant ajustée, [Cs] : concentration sérique du polluant, [pLip] : lipides prédictés, [Lip] : concentration des lipides totaux

4.2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées au moyen des logiciels Excel® (Microsoft Office 365) et RStudio (version 4.0.3, R Project for Statistical Computing). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. La normalité des données qu'elles soient démographiques ou relatives aux concentrations en polluants a été testée au moyen du test de Shapiro-Wilk. Les variables continues ont été comparées entre les volontaires diabétiques et les volontaires sains à l'aide du test t de Student ou du test des rangs signés de Wilcoxon (âge, IMC). Les différences entre les populations pour les variables catégorielles ont quant à elles été testées au moyen du test du χ^2 (sexe, antécédents familiaux de DT2 (jusqu'au troisième degré), origine, éducation, statut tabagique, consommation d'alcool (au minimum une unité d'alcool par semaine), activité physique (au minimum une heure par semaine, et pas moins de 30 minutes par séance)).

Seuls les polluants dont la fréquence de détection (DF) est supérieure à 30 % ont été inclus dans les modèles statistiques. Les valeurs situées en dessous de la LOQ ont été remplacées par $LOQ \times DF$ (202,203). Pour les analyses univariées et monopolluants, les polluants dont la fréquence de détection se situait entre 30 et 70 % ont été traités comme variables dichotomiques (détecté vs non détecté), tandis que les polluants dont la fréquence de détection était supérieure à 70 % ont été analysés en tant que variables continues. Pour cette dernière catégorie, les concentrations mesurées dans les populations ont été transformées en fonction de leur logarithme naturel afin de tendre vers une distribution normale.

L'association entre les polluants et le statut diabétique a été testée au moyen de régressions logistiques. Chaque modèle a été ajusté pour différentes covariables : l'âge, le sexe, l'IMC, les

antécédents familiaux de DT2, le niveau d'éducation, le statut tabagique, la consommation d'alcool et l'activité physique. L'association avec le statut diabétique a été interprétée en fonction de l'odds ratio (OR) ainsi que de l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) de ce dernier.

Les effets cocktails ont été étudiés à l'aide de deux méthodes statistiques : la weighted quantile sum regression et la Bayesian Kernel machine regression. Nous avons calculé des modèles distincts pour tous les polluants non persistants, pour tous les polluants persistants et enfin, pour l'ensemble des polluants simultanément.

La méthode WQS a été décrite dans l'article de Carrico et al. (2015) (194). En résumé, la régression WQS estime l'association entre une variable dépendante (dans notre cas, la présence du diabète ou non chez l'individu) et un mélange de polluants. Au sein de ce mélange, un poids est attribué à chaque composé en fonction de sa contribution à l'association mesurée pour le mélange par une approche par bootstrap. Le modèle est exprimé selon l'équation 6.

$$g(\mu) = \beta_0 + \beta_1 \left(\sum_{i=1}^c w_i q_i \right) + z' \varphi$$

Equation 6 : Weighted Quantile Sum regression

Dans cette équation, $g(\mu)$ est la fonction de liaison entre la variable dépendante et les variables prédictives, dans notre cas, $g(\mu)$ représente une fonction logit car notre variable dépendante est une variable binaire, β_0 correspond à intercept, z' est le vecteur de covariables, φ est le vecteur des coefficients de régression de ces covariables. Le terme $(\sum_{i=1}^c w_i q_i)$ représente l'index pondéré pour tous les polluants, ce qui permet d'intégrer en une seule variable un grand nombre de polluants dans le modèle statistique. La méthode WQS repose sur un système de score représenté ici par q_i qui correspond au score attribué à chaque individu en fonction du quantile de contamination pour le $i^{\text{ème}}$ polluant (nos modèles ont été calculés en fonction des quartiles). Ce score est pondéré par un poids w_i déterminé de manière empirique par un algorithme d'optimisation de manière à maximiser la vraisemblance du modèle, les poids ont été estimés grâce à un bootstrap de 500 itérations. Dans le modèle WQS, les poids de tous les polluants sont compris entre 0 et 1 et leur somme doit être égale à 1. Le coefficient de régression β_1 pour l'index peut être interprété comme l'effet de l'exposition cumulée des polluants du modèle. Si celui-ci est significatif, cela signifie que le mélange de

polluants est statistiquement associé à la variable dépendante. Pour identifier les « bad actors », il faut analyser les poids associés à chaque polluant du mélange. Le seuil de significativité pour les polluants est fixé à n^{-1} où n représente le nombre de polluants inclus dans le modèle, plus un polluant a un poids élevé dans le modèle, plus il sera associé à la variable dépendante.

La régression WQS ne calcule les associations que dans un sens en appliquant une contrainte non positive ou non négative sur le paramètre β_1 . Les effets négatifs et positifs doivent donc être estimés en conduisant les deux analyses séparément. Afin de déterminer avec quelle contrainte les modèles doivent être calculés, les OR calculés pour chaque polluant par les modèles de régression linéaire monopolluants ont été analysés. Pour les modèles appliqués sur les nPOP, deux modèles WQS ont été calculés, l'un dans lequel le coefficient est contraint à être non négatif et l'autre dans lequel il est contraint à être non positif. Pour les POP et pour le modèle calculé sur l'ensemble des polluants, un seul modèle a été calculé, contraint en non négatif car les modèles monopolluants ne montraient que des associations nulles ou positives pour les POP. Les modèles WQS ont été ajustés par les mêmes covariables que celles incluses dans les modèles de régression linéaire monopolluants.

Proposée récemment par Bobb et al. (2015) (195), la méthode BKMR permet de mettre en évidence l'effet de l'exposition à un mélange de polluants, en utilisant une fonction kernel (195,204). Elle permet de visualiser les fonctions de réponse individuelle pour chaque polluant tout en prenant en compte l'exposition aux autres polluants. Ce modèle peut également mettre en évidence d'éventuelles relations non monotones et permet d'examiner les interactions potentielles entre les polluants.

Étant donné l'impact de la colinéarité entre les polluants sur les modèles, les polluants ont été regroupés en fonction des corrélations de Spearman entre les concentrations mesurées. Trois groupes ont ainsi été construits sur la base d'un coefficient de corrélation supérieur à 0,6 (205):

- Un groupe contenant les PCB ;
- Un groupe contenant les PFAS à l'exception du PFHxS ;
- Un groupe contenant le 5-OH-MEHP et le 5-oxo-MEHP ;
- Les autres polluants ont été intégrés séparément dans le modèle.

Chaque modèle BKMR a été établi à l'aide de quatre chaines de Markov Monte-Carlo de chacune 50 000 itérations.

Dans un premier temps, le risque global d'exposition au mélange de polluants est représenté par une courbe de corrélation entre l'exposition à tous les polluants et la pathologie. Cette modélisation est réalisée en calculant pour différents percentiles, le risque attribuable au mélange de polluants lorsque ceux-ci sont fixés à un percentile donné et en le comparant avec le risque lorsque tous les polluants sont fixés à leur niveau médian.

Dans un second temps, le modèle permet d'estimer l'effet de l'exposition individuelle entre un polluant sur l'ensemble de sa gamme de concentration et la pathologie tandis que tous les autres polluants sont fixés à leur valeur médiane. Le modèle fournit alors une courbe dose-réponse pour chaque polluant individuellement.

Durant la modélisation, une sélection hiérarchique des variables est établie, le modèle calcule un lien de probabilité (posterior inclusion probabilities (PIP)) entre la variable dépendante, et la contamination par plusieurs substances. Ces PIP ont été calculées pour chaque groupe de polluants et pour chaque polluant au sein des groupes. Les PIP sont donc des scores de probabilité : plus leur valeur est élevée, plus la probabilité d'un impact du polluant sur la variable est importante. Les PIP des groupes de polluants ou les PIP individuelles supérieures à 0,5 ont été considérées comme significatives dans le modèle.

Enfin, le modèle BKMR permet de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les polluants. Il est en effet possible de calculer le risque attribuable à un polluant lorsque tous les autres polluants du mélange sont fixés au 25^e percentile (P25), à la médiane (P50) ou au 75^e percentile (P75). Si le risque attribuable au polluant individuel change significativement en fonction du quartile auquel sont fixés les autres polluants, c'est qu'il existe des interactions non additives.

Pour la modélisation de ces modèles multipolluants, seuls les polluants détectés dans plus de 75 % des échantillons ont été pris en compte dans les modèles. Pour le BKMR, en plus de la transformation en logarithme naturel, les polluants ont été centrés et réduits afin d'approcher la normalité et de réduire le coefficient de variabilité des données. En effet, les modèles BKMR sont sensibles à la distribution des données et aux valeurs extrêmes.

Pour ces analyses statistiques multipolluants, les extensions « miWQS », « bkmrhat » et « ggplot2 » pour RStudio ont été utilisées.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Caractéristiques de la population

Les caractéristiques démographiques de la population sont résumées dans le tableau 10. On observe quelques différences significatives entre les deux populations de l'étude. L'IMC est plus élevé chez les diabétiques (30,4 vs 25,2 kg/m²), on retrouve également une plus grande fréquence d'antécédents familiaux de DT2 dans cette population. Ces tendances étaient attendues compte tenu de l'association entre l'obésité et les problèmes métaboliques ainsi que la composante héréditaire du diabète de type 2. Le niveau d'éducation diffère également entre les volontaires sains et les individus diabétiques avec un niveau d'éducation globalement moins avancé un sein de la population diabétique. Cette dernière est également en moyenne plus fréquemment fumeuse, et plus sédentaire que nos volontaires sains. En revanche, la consommation d'alcool déclarée est supérieure dans la population saine. L'hémoglobine glyquée a été mesurée dans la population saine afin d'exclure la présence d'un volontaire sain dont le diabète n'aurait pas été diagnostiqué. Sans surprise, la valeur d'HbA1c est supérieure dans la population diabétique. Cependant, la valeur médiane de l'HbA1c chez nos volontaires sains est de 5,5 %, ce qui suggère la présence d'individus présentant une altération du métabolisme du glucose au sein de notre population non diabétique.

Caractéristiques		Diabétiques (n)	Contrôles (n)	p-value
Age (médiane en année)		60	60	0,404
Genre	Homme	68	52	
	Femme	37	46	0,090
IMC (médiane en kg/m ²)		30,4	25,2	<0,001
HbA1c (médiane en %)		7,0	5,5	<0,001
Antécédents de diabète familial	Non	39	69	
	Oui, type 2	62	28	<0,001
Degré de parenté	Inconnu	2	0	
	1	41	17	
	2	17	13	
	3	3	3	0,314
Niveau d'éducation	Primaire	7	2	
	Secondaire	54	27	
	Supérieur court	28	26	
	Supérieur long	5	8	
	Universitaire	8	21	
	Post-Universitaire	2	14	<0,001
	Fumeur	27	7	
Statut tabagique	Non-fumeur	77	90	<0,001
	Oui	59	80	
Consommation d'alcool	Non	45	18	<0,001
	Oui	43	66	
Activité physique	Non	62	31	<0,001

Tableau 10 : Paramètres démographiques de la population

4.3.2 Concentrations des polluants dans la population

Parmi les 50 polluants mesurés au cours de l'étude, 31 ont une DF supérieure à 30 %. Les concentrations mesurées dans l'ensemble de la population étudiée sont résumées dans les tableaux 11 et 12 pour les polluants urinaires et les polluants mesurés dans le sérum, respectivement.

Parmi les métabolites des phtalates, le MEP, le MnBP, le MiBP, le 5-OH-MEHP et le 5-oxo-MEHP ont été détectés dans au moins 93,9 % des échantillons. Les fréquences de détection et les niveaux de contamination de ces composés concordent avec ceux mesurés récemment au moyen de la même méthode analytique dans une population wallonne recrutée en 2015, puis prélevée une seconde fois en 2018 (68). En revanche, les fréquences de détection des métabolites du DINCH mesurées dans notre population sont légèrement inférieures à celles mesurées dans la population de 2018 de Pirard et Charlier (2022) (OH-MINCH : 23,0 % vs 35,6 % ; cx-MINCH : 20,4 % vs 34,4 %) (68).

Concernant les parabènes, la répartition des composés détectés dans les échantillons urinaires de notre population est cohérente avec les données de la littérature. Le MP est le parabène le plus fréquemment détecté, suivi de l'EP et du PrP. Le n-BP n'a presque pas été détecté dans notre population. Cette répartition des DF des parabènes ainsi que les médianes observées dans notre population concordent avec les données précédemment rapportées en Wallonie (68).

La BP-3 a été détectée dans environ deux tiers (63,8 %) des échantillons de notre population. Les niveaux de contamination observés dans notre étude concordent avec ceux mesurés dans notre zone géographique, généralement aux alentours de 1 ng/mL, comme décrit par Mustieles et al. (2023) (74).

Deux métabolites des pesticides organophosphorés ont été principalement mesurés dans notre population : le DEP et le DMTP détectés dans respectivement 91,9 % et 74,7 % des échantillons de la population. Les résultats du biomonitoring wallon effectué chez les adultes montrent des niveaux de contamination semblables à ceux observés dans l'étude actuelle (P50 DEP = 1,20 µg/L ; P50 DMTP = 0,820 µg/L) (37).

Trois bisphénols ont été mesurés dans plus de 30 % de notre population, le BPF, le BPA et le BPS. Le bisphénol le plus fréquemment détecté est le BPS (70,5 % DF ; P50 = 0,439 µg/L) suivi

du BPF (64,4 % DF ; P50 = 0,101 µg/L) et du BPA qui a été quantifié dans 39,1 % des échantillons. On observe une évolution tant des DF que des niveaux moyens de contamination depuis 2018. Dans une population de 90 individus wallons prélevés en 2018 et dont les échantillons ont été analysés avec les mêmes méthodes analytiques que celles utilisées dans notre étude, les DF et les médianes de contamination étaient les suivantes : BPA : 77 % DF, P50 = 0,79 µg/L ; BPS : 45,6 % DF, P50 = <0,09 µg/L ; BPF : 57,8 % DF, P50 = 0,12 µg/L (68). Cette évolution des niveaux de contamination ainsi que des DF pourrait s'expliquer par l'implantation de restrictions que ce soit au niveau des tolérances de migration des bisphénols depuis les emballages dans l'alimentation ou encore de l'utilisation dans les papiers thermiques (206,207). Ces restrictions forcent les industriels à substituer le BPA par d'autres composés comme le BPS et le BPF (59).

Dans le sérum, certains composés de la famille des PFAS n'ont été détectés que dans un faible pourcentage d'échantillons. C'est le cas du PFHpA, du PFHxA et du PFUnDA qui n'ont été détectés que dans respectivement 2,5 %, 1 % et 7,5 % des échantillons. A l'inverse, certains PFAS ont été détectés dans presque tous échantillons sériques de l'étude : le PFHxS, le PFOA, les PFOS total et linéaire, et le PFNA ont été détectés dans au moins 90 % des échantillons. Parmi ceux-ci, c'est le PFOS total qui est le PFAS prédominant dans l'organisme avec une concentration médiane de 5,67 ng/mL. Cette tendance a déjà été observée en Wallonie lors de l'évaluation des niveaux de contamination de 242 individus par les PFAS. Les composés les plus détectés étaient les PFHxS, le PFOA, Le PFDA, le PFNA et le PFOS linéaire (le PFOS total n'a pas été mesuré dans cette étude) (23). Les concentrations observées dans notre étude sont légèrement inférieures aux concentrations mesurées par Pirard et al. en 2020 (23). Il existe souvent des disparités dans les concentrations des PFAS en fonction des lieux de résidence des volontaires. Ainsi, les concentrations de ces mêmes PFAS mesurées dans une population vivant en Flandre étaient supérieures à celles de notre population (208). La différence entre les périodes de prélèvement peut également justifier ces disparités, certains PFAS ont en effet montré une tendance à la décroissance dans l'environnement (209).

Parmi les PCB, les congénères 138, 153, 156, et 180 ont été détectés dans plus de 95,0 % des échantillons sériques des volontaires de l'étude. Le PCB prédominant est le PCB 153 avec une concentration médiane de 368 pg/mL. Les concentrations observées dans notre étude sont similaires à celles décrites dans une population wallonne dont les concentrations de plusieurs

PCB ont été mesurées en 2018. Elles concordent également avec celles décrites dans une population allemande mesurées en 2015, confirmant ainsi la tendance à la bioaccumulation de ces composés (28,184). Les congénères les moins chlorés : les PCB 28, 52 et 101 n'ont été mesurés que dans 0,995 % à 3,48 % des échantillons de l'étude.

Le 4,4'-DDE a quant à lui été détecté dans 99,5 % des échantillons de sérum de notre cohorte. Les concentrations mesurées concordent avec celles mesurées par Pirard et al. (2018) auprès de 252 Wallons. Les niveaux de contamination de notre population sont légèrement supérieurs à ceux observés dans une population allemande. Cependant cette étude inclut des enfants et des adolescents de moins de 25 ans, non contemporains de l'utilisation du DDT, ce qui pourrait expliquer les concentrations plus élevées en 4,4'-DDE observées dans notre étude (184).

Dans notre étude, les niveaux de contaminations concordent généralement avec les données d'autres populations sans exposition professionnelle vivant, dans la mesure du possible, dans la même région ou dans des régions frontalières où les normes de restriction pour les composés mesurés dans l'étude sont identiques. Nous pouvons donc conclure que notre population ne présente probablement pas de biais d'exposition.

Résumé des concentrations polluants urinaires										
Composés	n	LOQ	%>LOQ	GM	Min	P25	P50	P75	Max	IQR
Bisphénols & triclosan (µg/L)										
BPAF	197	0,29	0,507	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,405	
BPF	191	0,07	64,4	0,149	<LOQ	<LOQ	0,101	0,33	11,5	0,282
BPA	197	0,29	39,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,51	12,3	0,396
BPZ	190	0,06	12,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,99	
BPS	190	0,09	70,5	0,29	<LOQ	<LOQ	0,439	1,18	273	1,12
BPAP	195	0,21	2,05	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,97	
TCS	197	0,33	26,9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,41	52,0	0,319
Dialkyls phosphates (µg/L)										
DEP	198	0,50	91,9	2,26	<LOQ	1,05	2,29	4,65	76,8	3,60
DMTP	198	0,50	74,7	1,14	<LOQ	<LOQ	0,99	2,17	26,2	1,77
DMDTP	198	0,50	18,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,2	
DETP	198	0,50	16,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,86	
DEDTP	198	0,50	4,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,86	
Parabènes (µg/L)										
MP	185	0,79	89,2	3,98	<LOQ	1,46	3,00	6,30	2710	4,84
EP	186	0,30	50,5	0,479	<LOQ	<LOQ	0,30	1,20	139	1,05
PrP	196	0,36	21,9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	199	
n-BP	196	1,00	0,510	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7,29	
Phtalates (µg/L)										
MEP	196	0,94	100	26,0	0,940	10,0	19,8	53,6	2865	43,6
MnBP	196	0,99	99,0	14,0	<LOQ	6,25	14,3	25,1	391	18,8
MiBP	196	1,23	93,9	9,22	<LOQ	4,09	8,57	19,6	200	15,5
5-oxo-MEHP	196	0,13	99,5	1,94	<LOQ	1,05	1,78	3,80	39,9	2,74
5-OH-MEHP	195	0,16	100	3,19	0,300	1,81	2,92	6,22	75,5	4,41
MBzP	196	0,61	82,7	2,23	<LOQ	0,79	1,91	4,67	115	3,87
MEHP	196	0,62	46,9	0,648	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,29	24,6	1,00
cx-MiNP	191	2,00	69,6	2,80	<LOQ	<LOQ	2,43	4,18	148	2,79
OH-MiDP	196	2,00	4,10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	34,8	
OH-MINCH	196	2,00	23,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	130	
cx-MINCH	196	2,00	20,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	50,4	
Benzophénone (µg/L)										
BP-3	196	0,20	63,8	0,62	<LOQ	<LOQ	0,400	1,61	863	1,47

Tableau 11 : Résumé des concentrations pour les polluants urinaires

Composés	n	Résumé des concentrations pour les polluants sériques								
		LOQ	%>LOQ	GM	Min	P25	P50	P75	Max	IQR
PFAS (ng/mL)										
PFHpA	200	0,10	2,50	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,166	
PFHxA	200	0,10	1,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,136	
PFHxS	200	0,10	96,5	0,639	<LOQ	0,461	0,667	0,994	5,02	0,53
PFOA	200	0,50	90,5	1,07	<LOQ	0,709	1,03	1,54	11,8	0,82
PFNA	200	0,10	95,5	0,356	<LOQ	0,249	0,359	0,531	1,79	0,28
PFOS total	200	0,50	99,5	5,46	<LOQ	3,29	5,67	9,29	52,1	5,99
PFOS linéaire	200	0,50	97,5	2,51	<LOQ	1,52	2,54	4,25	36,2	2,72
PFDA	200	0,10	67,0	0,138	<LOQ	<LOQ	0,134	0,209	2,34	0,14
PFUnDA	159	0,30	7,50	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,45	
PCB (pg/mL)										
PCB 28	201	25	0,995	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	66,3	
PCB 52	201	25	2,49	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	54,9	
PCB 101	201	21	3,48	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	33,7	
PCB 105	201	7,0	38,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9,33	37,9	6,61
PCB 114	201	6,0	62,7	15,8	<LOQ	<LOQ	18,9	48,6	174	44,8
PCB 118	201	20	82,6	38,9	<LOQ	24,7	38,2	59,0	182	34,3
PCB 138	201	12	99,5	208	<LOQ	140	205	335	970	194
PCB 153	201	12	99,5	366	<LOQ	255	368	604	2590	349
PCB 156	201	10	95,0	38,4	<LOQ	25,5	38,2	59,9	268	34,3
PCB 157	201	15	20,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	36,1	
PCB 167	201	10	48,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16,3	43,8	11,4
PCB 180	201	5,0	99,5	333	<LOQ	238	342	547	1334	310
Pesticides organochlorés (pg/mL)										
4,4'-DDE	201	15	99,5	575	<LOQ	290	580	1005	6801	7154

Tableau 12 : Résumé des concentrations pour les polluants sériques

4.3.3 Impact des méthodes d'ajustement des dosages

Afin étudier l'impact des méthodes d'ajustement des dosages, pour chacun des polluants détectés dans plus de 70 % des échantillons, quatre modèles de régression logistique ont été appliqués en utilisant les différentes méthodes d'ajustement.

Les quatre modèles ont été également appliqués aux polluants lipophiles sériques (PCB et 4,4'-DDE). Les OR ainsi que les intervalles de confiances à 95 % de ces modèles sont décrits dans la figure 12 pour les polluants urinaires et dans la figure 13 pour les polluants sériques.

Les PFAS ne se stockent généralement pas dans les compartiments lipophiles et possèdent plutôt une affinité pour les protéines plasmatiques et principalement l'albumine. Ces composés ne sont par conséquent pas concernés par l'ajustement (210–212).

Pour les polluants urinaires, il existe plusieurs paramètres permettant d'ajuster les concentrations, nous avons d'emblée écarté l'ajustement par l'osmolalité urinaire car celle-ci n'est pratiquement pas employée dans la littérature, notamment parce qu'elle est en partie influencée par le régime alimentaire. Nous avons également choisi de ne pas recourir à la gravité spécifique car ce paramètre est sensible à la présence de molécules de sucre dans l'urine, il y avait donc un risque important d'observer un biais entre notre population de patients et celle des contrôles.

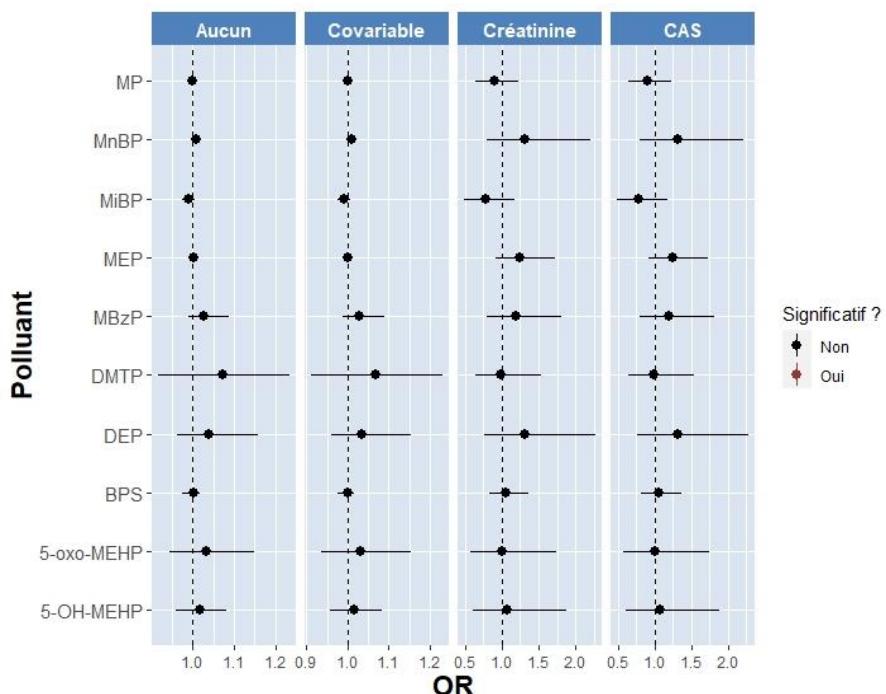


Figure 12 : Modèles de régression logistique pour les différentes méthodes d'ajustement par la créatinine.

Aucun : aucun ajustement ; Covariable : créatinine comme covariable dans les modèles ; Créatinine : concentration/créatinine ; CAS : « covariate-adjusted standardization »

Nous avons donc pris la décision de recourir à l'ajustement par la créatinine urinaire. Ce choix n'est néanmoins pas exempt de limitations, en effet, la concentration de créatinine urinaire varie en fonction de certains paramètres comme la masse musculaire et la fonction rénale. Le diabète étant un facteur de risque important de dégradation de la fonction rénale, la possibilité de l'existence d'un biais entre nos cas et nos contrôles n'est donc pas à négliger. Sur la figure 12, nous observons que quelle que soit la méthode d'ajustement choisie, aucune association entre polluant et diabète n'est significative. Néanmoins, nous constatons également que les résultats obtenus diffèrent selon les méthodes d'ajustement. L'absence d'ajustement ou l'introduction de la concentration de créatinine urinaire dans le modèle statistique donnent des résultats similaires. Nous avons expliqué dans l'introduction pourquoi

l’absence d’ajustement n’était pas souhaitable, l’observation de résultats similaires en ajoutant la créatinine comme covariable dans le modèle nous incite donc à penser que cette méthode d’ajustement n’est pas non plus optimale. La correction des concentrations des polluants urinaires par la créatinine urinaire et l’utilisation de l’indice CAS donnent des résultats semblables entre eux (mais différents des deux méthodes précédentes). Nous avons choisi de privilégier la méthode CAS pour la suite de notre étude, car celle-ci permet de tenir compte de paramètres comme l’âge et le sexe. Ceci gomme, au moins partiellement, l’influence de la masse musculaire (qui est en partie associée à l’âge et au sexe) et de la qualité de la fonction rénale (qui a tendance à se dégrader avec l’âge). Ce choix est également soutenu par la publication de O’Brien et al. qui ont démontré au moyen de simulations statistiques, que l’utilisation de l’indice CAS pour l’ajustement des polluants urinaires était plus performante que la correction simple par la concentration de créatinine urinaire (182). Il faut également noter que les niveaux de créatinine urinaire n’étaient statistiquement pas différents entre les deux sous populations de notre étude, ce qui peut expliquer que les résultats obtenus avec la méthode « créatinine » et la méthode « CAS » ne présentaient pas de différences significatives.

Pour les polluants lipophiles sériques, le tableau est sensiblement différent : tout d’abord, l’emploi d’une méthode d’ajustement, quelle qu’elle soit, entraîne un changement radical de l’interprétation des résultats puisque la plupart des associations entre nos polluants et le diabète deviennent significatives alors qu’elles ne l’étaient pas sans ajustement. Mais contrairement à ce qu’on observe pour les polluants urinaires, nous ne remarquons pas de différences notables entre les trois méthodes d’ajustement (figure 13).

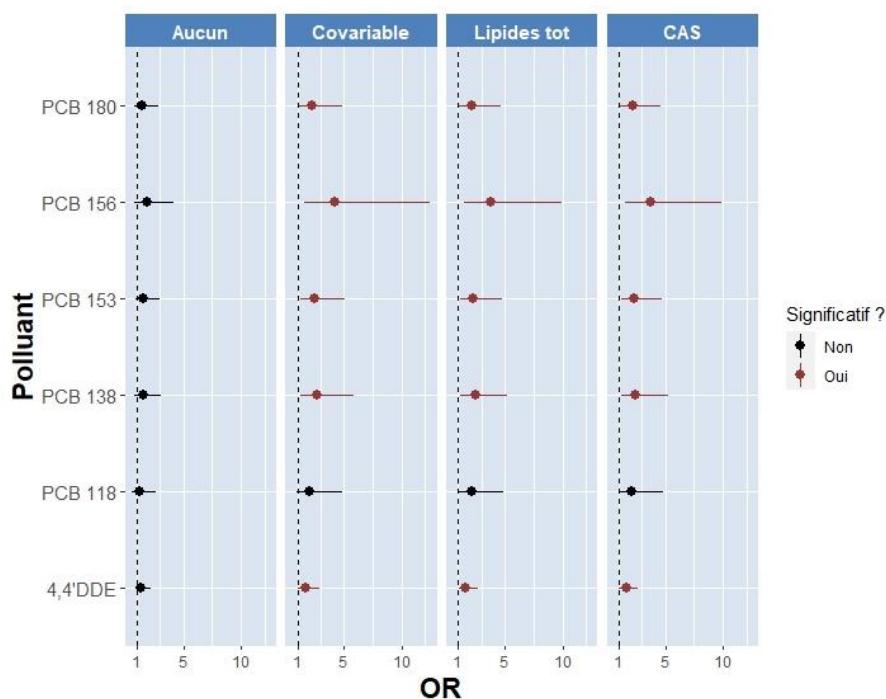


Figure 13 : Modèles de régression linéaire pour les différentes méthodes d'ajustement par les lipides. Aucun : aucun ajustement ; Covariable : lipides totaux comme covariable dans les modèles, Lipides tot : concentration/lipides totaux ; CAS : « covariate-adjusted standardization »

Cet impact de l'ajustement par les lipides peut s'expliquer par les taux significativement moins élevés de cholestérol et de lipides totaux de la population diabétique par rapport aux contrôles sains (tableau 13). En effet, pour prévenir d'éventuelles complications cardiaques du DT2 (213), les diabétologues prescrivent le plus souvent des médicaments hypocholestérolémiant à leurs patients. Ainsi, si les concentrations sériques volumétriques de PCB et de 4,4'-DDE sont comparables entre nos deux populations, elles sont par contre significativement plus élevées chez les patients diabétiques lorsque qu'elles sont rapportées par gramme de lipides dans le sang. Comme mentionné dans l'introduction, les concentrations de polluants lipophiles ajustées par les lipides totaux sont corrélées avec la charge totale en polluants lipophiles de l'organisme d'un individu. Ceci est d'autant plus vrai que les patients diabétiques ont un IMC et donc une proportion de masse graisseuse plus élevés que notre population saine. Ainsi l'ajustement de nos modèles statistiques par la lipémie, quelle que soit la méthode utilisée, permet de mettre en évidence des différences significatives entre patients et contrôles sains. Ceci souligne l'importance de l'ajustement par les lipides totaux. Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer l'usage de médicaments hypocholestérolémiant dans notre population saine, ceci nous aurait permis d'affiner nos analyses statistiques.

	Diabétiques		Sains		p-value
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	
Triglycérides (mg/dL)	196	155	128	109	<0,001
Cholestérol (mg/dL)	151	146	211	211	<0,001
Lipides totaux (g/L)	6,02	5,66	6,65	6,64	<0,001

Tableau 13 : Répartition des lipides mesurés chez les volontaires sains et diabétiques.

Pour la suite de notre étude, nous avons décidé d'employer la correction des concentrations de polluants par les lipides totaux mesurés. En effet, nous n'avons observé aucune différence notable entre les trois méthodes d'ajustement avec nos données, mais les simulations statistiques de O'brien et al., ont montré que c'était cette méthode qui était la plus appropriée pour les polluants sériques lipophiles (182).

En résumé, le choix des méthodes d'ajustement des dosages pour les statistiques est le suivant :

- Polluants urinaires dichotomisés : introduction de la créatinine comme covariable dans les modèles statistiques ;
- Polluants sériques lipophiles dichotomisés : introduction des lipides totaux comme covariable dans les modèles statistiques ;
- Polluants sériques non lipophiles dichotomisés (PFAS) : pas de correction du modèle statistique ;
- Polluants urinaires continus : concentrations corrigées par la CAS et exprimées en $\mu\text{g/mL}$;
- Polluants sériques lipophiles continus : concentrations corrigées par le taux de lipides totaux (concentrations exprimées en pg/g de lipides) ;
- Polluants sériques non lipophiles continus (PFAS) : utilisation des concentrations volumétriques.

4.3.4 Associations entre les polluants et le statut diabétique

4.3.4.1 Analyses statistiques monopolluants

L'étude de l'impact des polluants sur le statut diabétique implique d'inclure systématiquement des covariables de nos populations dans les modèles statistiques. Ainsi, si les modèles monovariés peuvent nous donner une tendance sur les différences des niveaux de contamination entre les populations, ils sont trop limités pour interpréter un lien potentiel entre les contaminations et le DT2. C'est pourquoi ils ne sont pas discutés dans cette partie du travail. Ils sont disponibles en annexe (Annexe 1).

Des modèles de régression logistique ont été réalisés afin de mettre en évidence le lien éventuel entre les PE et le statut diabétique, pour les polluants dichotomisés et continus. Les OR, IC 95 % et p-valeurs des régressions logistiques pour les polluants mesurés dans l'urine sont disponibles dans le tableau 14. Aucun polluant urinaire ne montre de relation significative avec le statut diabétique dans notre population.

Le tableau 15 présente les OR et les IC à 95 % obtenus pour les modèles de régression logistique ajustés par les différentes covariables, concernant les polluants mesurés dans le sérum. Plusieurs liens significatifs sont mis en évidence entre la contamination par un des polluants sérieux et le statut diabétique. Parmi les polluants dichotomisés, seul le PCB 167 présente un OR significatif, indiquant une relation positive avec le statut diabétique. Pour les polluants analysés sous forme continue, le PFHxS est le seul PFAS positivement associé avec le statut diabétique. Quatre PCB (les congénères 138, 153, 156 et 180) montrent une association positive avec le statut diabétique, tandis que le PCB 118 est à la limite du seuil de significativité (OR (IC 95 %) : 2,14 (0,960 - 4,89) ; p-valeur : 0,065). Le 4,4'-DDE est également positivement associé avec le DT2.

Polluant	OR	IC 95 %	P-value
TCS (D vs ND)	1,73	0,637 - 4,85	0,285
BPA (D vs ND)	2,44	0,890 - 7,17	0,091
BPF (D vs ND)	0,867	0,322 - 2,00	0,774
EP (D vs ND)	1,61	0,604 - 4,53	0,348
PrP (D vs ND)	0,705	0,213 - 2,27	0,559
MEHP (D vs ND)	1,25	0,481 - 3,32	0,648
cx-MiNP (D vs ND)	1,93	0,669 - 5,76	0,226
OH-MINCH (D vs ND)	0,421	0,142 - 1,20	0,108
cx-MINCH (D vs ND)	0,695	0,237 - 2,02	0,503
BP3 (D vs ND)	0,668	0,231 - 1,86	0,445
BPS	1,06	0,823 - 1,36	0,645
DEP	1,31	0,767 - 2,28	0,326
DMTP	0,993	0,640 - 1,54	0,975
MP	0,901	0,650 - 1,22	0,513
MEP	1,25	0,918 - 1,73	0,162
MnBP	1,32	0,793 - 2,22	0,282
MiBP	0,772	0,493 - 1,18	0,241
5-oxo-MEHP	1,00	0,576 - 1,75	0,989
5-OH-MEHP	1,07	0,605 - 1,89	0,806
MBzP	1,19	0,799 - 1,81	0,389

Tableau 14 : OR des modèles multivariés monopolluants pour les composés mesurés dans l'urine.

Polluant	OR	IC 95 %	P-value
PFDA (D vs ND)	0,800	0,272 - 2,36	0,683
PCB 105 (D vs ND)	2,32	0,881 - 6,45	0,0939
PCB 114 (D vs ND)	0,627	0,218 - 1,73	0,374
PCB 157 (D vs ND)	1,86	0,580 - 6,24	0,304
PCB 167 (D vs ND)	3,39	1,31 - 9,31	0,0141
PFHxS	2,06	1,03 - 4,33	0,0457
PFOA	1,67	0,723 - 3,95	0,234
PFNA	1,09	0,521 - 2,28	0,822
PFOS total	1,74	0,930 - 3,32	0,0864
PFOS linéaire	1,18	0,634 - 2,25	0,604
PCB 118	2,14	0,960 - 4,89	0,065
PCB 138	2,45	1,21 - 5,25	0,0149
PCB 153	2,32	1,21 - 4,74	0,0133
PCB 156	3,75	1,54 - 9,92	0,00494
PCB 180	2,19	1,12 - 4,67	0,0254
4,4'-DDE	1,65	1,03 - 2,68	0,0391

Tableau 15 : OR des modèles multivariés monopolluants pour les composés mesurés dans le sérum.

4.3.4.2 Modèles multipolluants.

Etant donné que les modèles monopolluants ne peuvent répondre entièrement à la question de l'effet des PE sur le DT2, nous avons évalué l'effet cocktail pour les polluants détectés dans plus de 75 % des échantillons en utilisant les méthodes WQS et BKMR

4.3.4.2.1 Modèles WQS

Pour les polluants sériques inclus dans les analyses statistiques multipolluants (PFHxS, PFOA, PFNA, PFOS total et linéaire, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 180 et le 4,4'-DDE) aucun des OR rapportés dans le tableau 6 n'est inférieur à 1, au contraire, plusieurs sont positivement et significativement associés au DT2. Dès lors, il n'est pas nécessaire de calculer le modèle en non positif. Pour les polluants urinaires, plusieurs OR rapportés dans le tableau 5 sont inférieurs à 1. Même si les valeurs ne sont pas significatives, l'investigation de l'effet cocktail au moyen du modèle WQS paramétré en non positif a été effectuée en plus de celui paramétré en non négatif. Pour l'analyse englobant l'intégralité des composés inclus dans les statistiques multipolluants, seul le modèle en non négatif a été réalisé en raison de l'interprétation des résultats monopolluants et des OR obtenus par les différentes régressions WQS calculées pour les polluants urinaires et sériques séparément. Les OR et les IC 95 % obtenus pour les différents indices WQS sont résumés dans le tableau 16. Les résultats complets des différents modèles WQS sont disponibles en annexe (Annexe 2).

WQS	OR (IC 95 %)	p-value
Poluants urinaires		
Non négatif	1,97 (1,01 - 3,83)	0,045
Non positif	1,03 (0,54 - 1,97)	0,927
Poluants sériques		
Non négatif	4,22 (1,93 - 9,23)	<0,001
Modèle incluant tous les polluants		
Non négatif	8,95 (2,85 - 28,1)	<0,001

Tableau 16 : OR des modèles WQS

Les résultats des différentes régressions WQS paramétrées en non négatif indiquent que le mélange de polluants sériques, le mélange de polluants urinaires et le mélange incluant tous les polluants sont positivement associés au DT2. Pour les polluants urinaires, lorsque le paramètre β tend à être non positif, le mélange de polluants n'est pas significativement associé au statut diabétique.

Pour identifier les « bad actors », il faut analyser les poids obtenus pour chaque polluant dans les différents modèles. Pour les polluants mesurés dans l'urine, la figure 14 représente les poids des polluants inclus dans le modèle contraint en non négatif. Le DEP (poids moyen = 0,394) et le MEP (poids moyen = 0,249) sont les deux composés dont le poids dépasse le seuil de significativité (0,125). Le 5-OH-MEHP est tout juste sous ce seuil avec un poids moyen de 0,123.

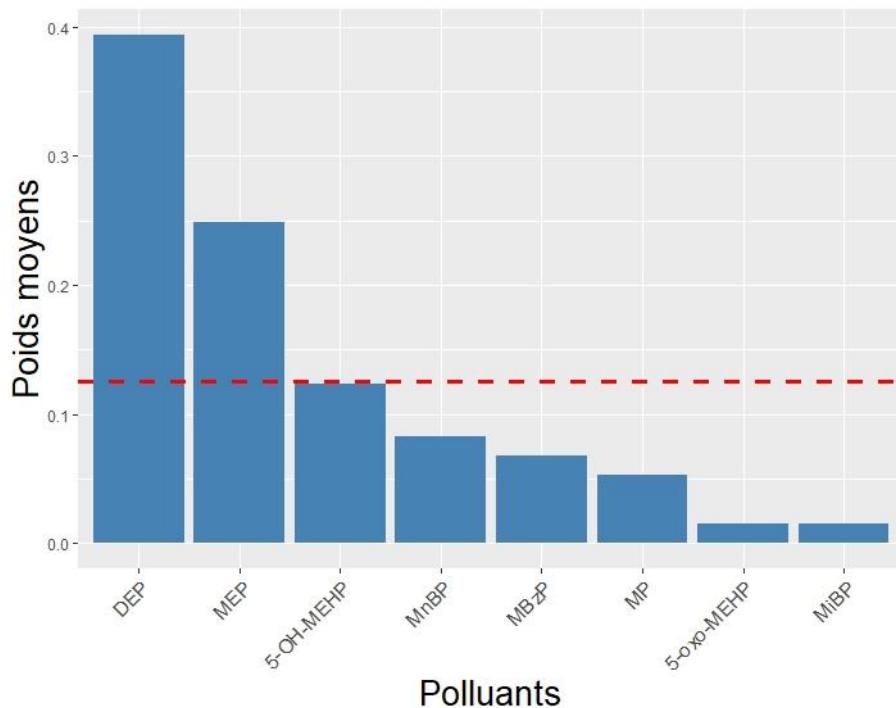


Figure 14 : Poids des composés pour le modèle WQS incluant les polluants urinaires. La ligne rouge pointillée représente le seuil de significativité.

Pour les composés mesurés dans le sérum, les poids de quatre composés sont supérieurs au seuil de significativité fixé à 0,091 : le PFHxS (poids moyen = 0,228), le PCB 180 (poids moyen = 0,205), le 4,4'-DDE (poids moyen = 0,167) et le PCB 118 (poids moyen = 0,143). Ceux-ci sont représentés dans la figure 15.

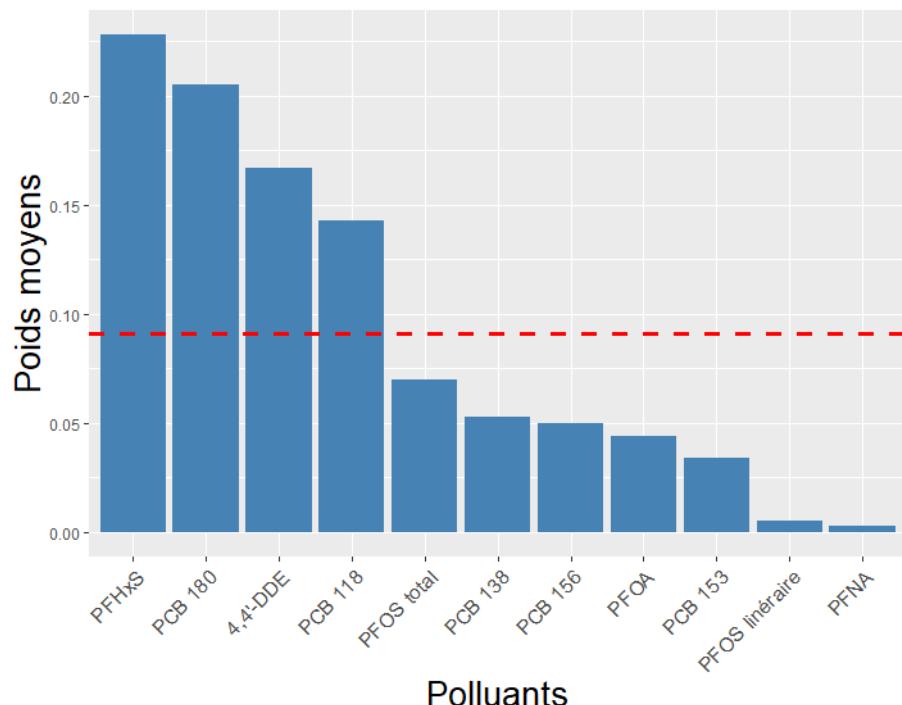


Figure 15 : Poids des composés pour les modèles WQS incluant les polluants sérieux. La ligne rouge pointillée représente le seuil de significativité.

Lorsque tous les polluants sont inclus dans le modèle WQS, plusieurs des composés sont identifiés comme « bad actors ». En plus des composés déjà identifiés par les autres modèles WQS, le PFOS total et le 5-OH-MEHP ont un poids supérieur au seuil de significativité fixé à 0,052. Les poids de ce modèle sont décrits dans la figure 16.

Les composés identifiés comme « bad actors » dans ce modèle sont : le DEP (poids moyen = 0,147) ; le 4,4'-DDE (poids moyen = 0,137) ; le PCB 180 (poids moyen = 0,101) ; PCB 118 (poids moyen = 0,099) ; PFOS total (poids moyen = 0,098) ; MEP (poids moyen = 0,060) ; 5-OH-MEHP (poids moyen = 0,054).

Les résultats de nos modèles WQS indiquent que les mélanges de substances que ce soit, séparément pour les polluants urinaires et sérieux, ou lorsque tous les polluants sont inclus dans le modèle, sont positivement associés aux DT2.

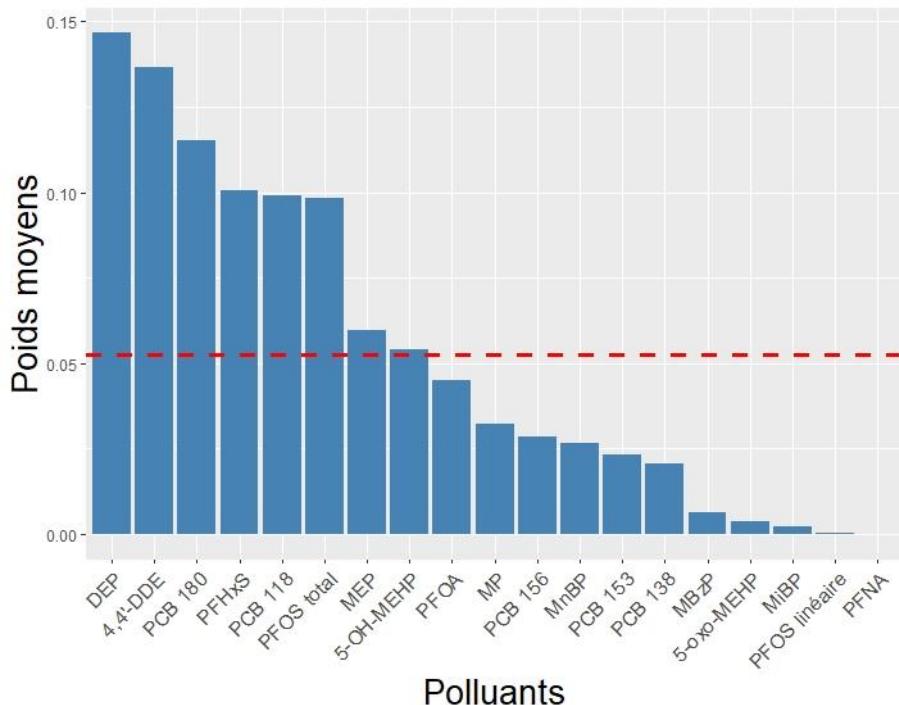


Figure 16 : Poids des composés pour le modèle WQS incluant tous les polluants. La ligne rouge pointillée représente le seuil de significativité.

4.3.4.2.2 Modèle BKMR

Les modèles BKMR ont été appliqués de la même façon que les modèles WQS, séparément sur les composés mesurés dans l'urine, les composés mesurés dans le sérum et sur tous les composés ensemble.

Modèle BKMR incluant les polluants urinaires :

L'investigation des risques globaux ne montre pas de tendance entre l'augmentation des quantiles de contamination et le statut diabétique comme présenté dans la figure 17. Le modèle n'étant pas associé au diabète de type 2, nous n'irons pas plus loin dans l'interprétation des résultats. Les réponses individuelles, les PIP et les interactions sont disponibles en annexe à titre informatif (Annexe 3).

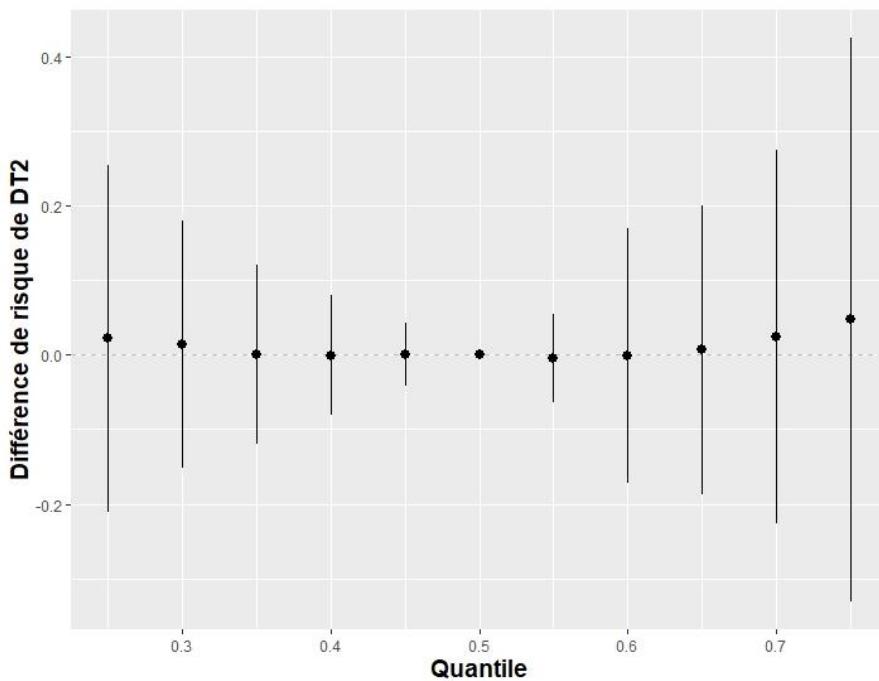


Figure 17 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant les polluants urinaires.

Modèle BKMR incluant les polluants sériques

Pour le modèle BKMR réalisé sur le mélange de polluants mesurés dans le sérum, nous observons une tendance positive entre l'augmentation des concentrations et le statut diabétique (figure 18).

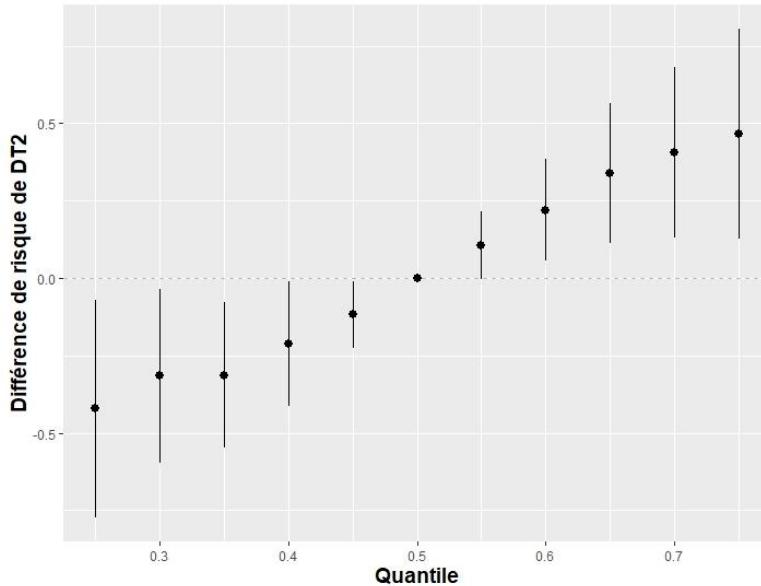


Figure 18 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant les polluants sériques.

Pour ce modèle, les réponses individuelles indiquent un effet linéaire de certains polluants sur leur gamme de concentration. Celles-ci sont présentées dans la figure 19. Le PFHxS, le 4,4'DDE et le PCB 138 présentent une pente positive entre le statut diabétique et les concentrations. Le PFOS linéaire montre une tendance inverse.

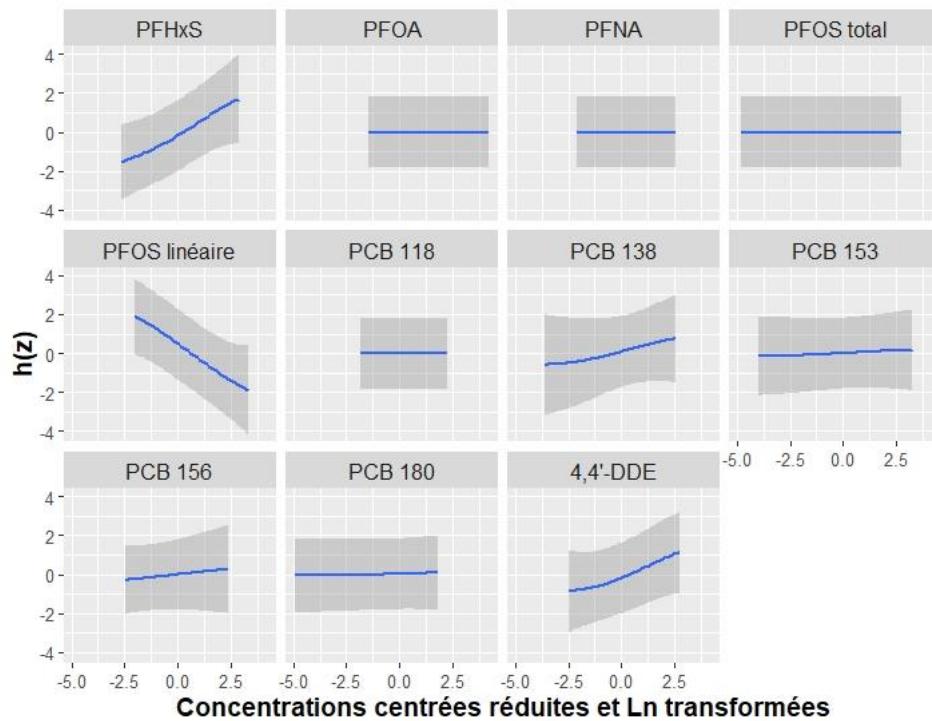


Figure 19 : Réponses individuelles pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques.

Pour identifier les substances considérées comme les contributeurs principaux des modèles BKMR, il faut interpréter les PIP. Celles du modèle BKMR appliquée aux polluants mesurés dans le sérum sont présentées dans le tableau 17.

Polluant	Groupe	Groupe PIP	cond PIP
PFHxS	1	0,999	
PFOA	2	1	0,003
PFNA	2	1	0,001
PFOS total	2	1	0,000
PFOS linéaire	2	1	0,994
PCB 118	3	0,978	0,0123
PCB 153	3	0,978	0,127
PCB 138	3	0,978	0,496
PCB 156	3	0,978	0,279
PCB 180	3	0,978	0,0837
4,4'-DDE	4	0,921	

Tableau 17 : PIP pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques.

Pour les polluants sériques, les composés contribuant le plus au modèle sont le PFHxS, le PFOS linéaire ainsi que le 4,4'-DDE. Le groupe contenant les PCB est également un contributeur important du modèle. Cependant, aucun PCB n'est individuellement identifié par le modèle BKMR.

La figure 20 présente le risque attribué à chaque polluant alors que la valeur des autres polluants est fixée à leurs P25, médiane et P75. Ce graphique permet de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre polluants. Dans ce modèle, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction significative entre les polluants.

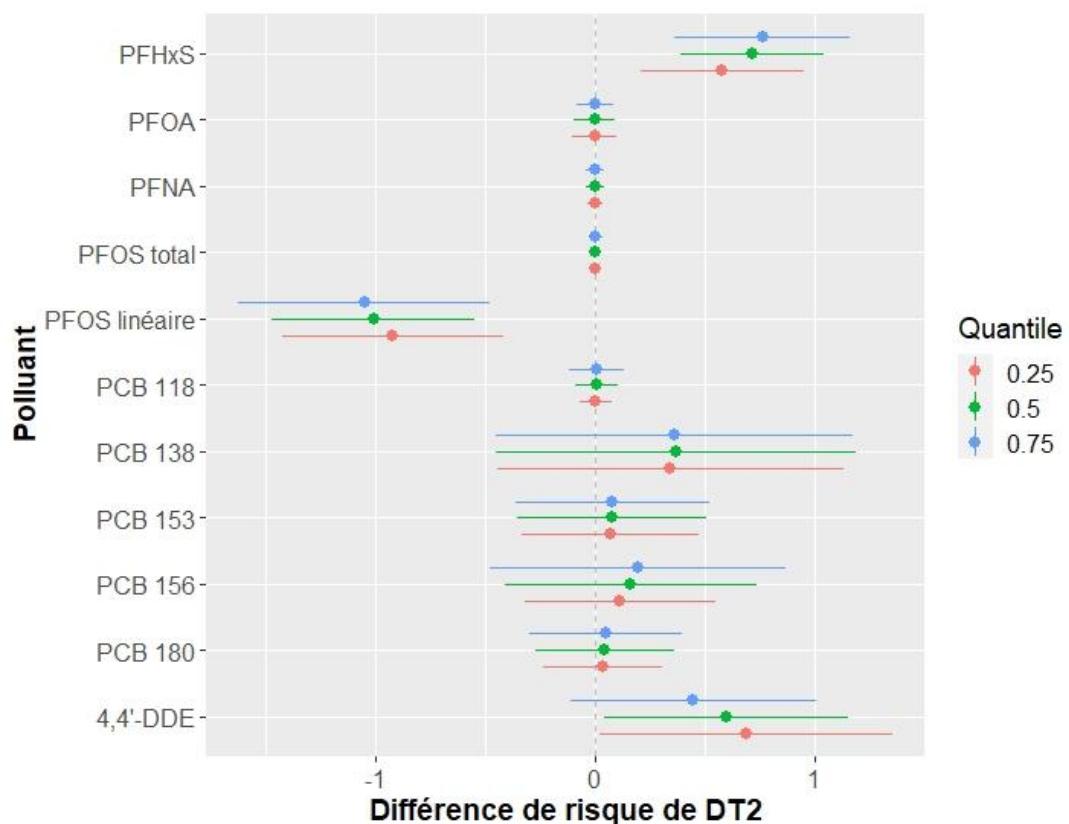


Figure 20 : Interactions entre les polluants pour le modèle BKMR incluant les polluants sériques.

Modèle BKMR sur tous les composés

Le modèle BKMR intégrant tous les composés montre une tendance positive entre le statut diabétique et les concentrations des polluants malgré un IC 95 % assez large. Nous observons également une légère tendance non monotone lorsque les concentrations dépassent le percentile 70 (figure 21).

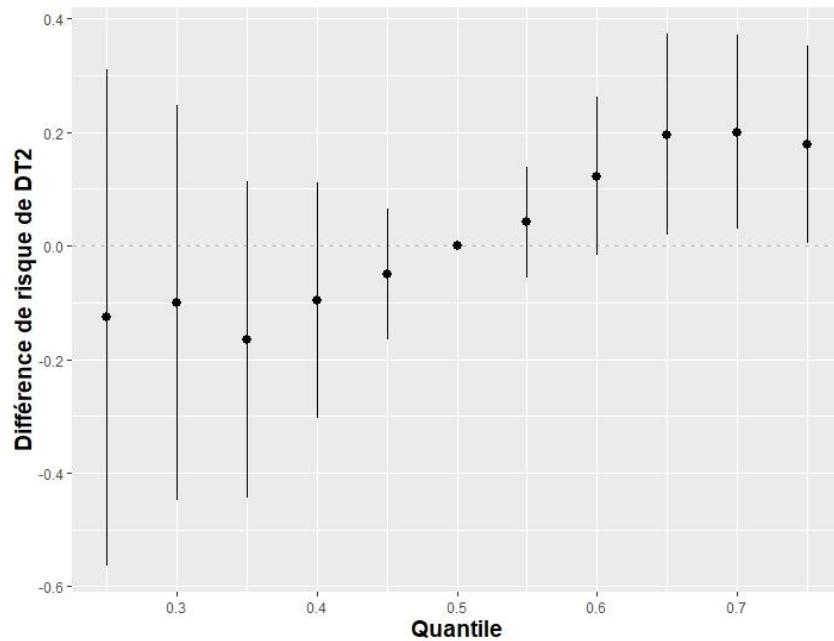


Figure 21 : Résumé des risques globaux pour le mélange incluant tous les polluants.

La figure 22 présente les réponses individuelles pour chaque polluant contenu dans le mélange global. Le PFHxS, le 4,4'-DDE et le PCB 138 présentent une tendance positive. A l'inverse, le MP, le MnBP, les MiBP, le MBzP ainsi que le PFOS linéaire présentent une association inverse avec le DT2.

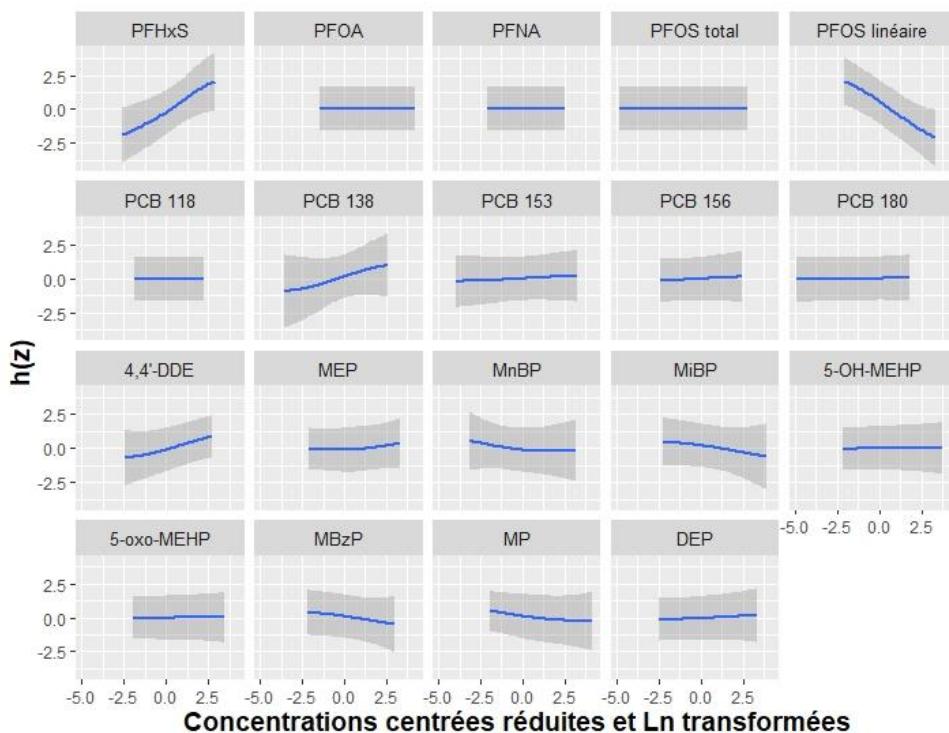


Figure 22 : Réponses individuelles pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.

Les PIP obtenues pour le modèle incluant tous les polluants, sont résumées dans le tableau 18. Celles-ci indiquent que les substances qui contribuent principalement au modèle sont le PFHxS, le PFOS linéaire, le PCB 138, et le 4,4'-DDE. Plusieurs composés mesurés dans l'urine présentent également des PIP supérieures à 0,5 : le MP, le MEP, le MnBP, le MiBP, le MBzP et le DEP.

Polluant	Groupe	Groupe PIP	cond PIP
PFHxS	1	0,998	
PFOA	2	1	0,0013
PFNA	2	1	0,0018
PFOS total	2	1	0,0013
PFOS linéaire	2	1	0,995
PCB 118	3	0,939	0,0137
PCB 153	3	0,939	0,147
PCB 138	3	0,939	0,598
PCB 156	3	0,939	0,160
PCB 180	3	0,939	0,0811
4,4'-DDE	4	0,887	
MP	5	0,608	
MEP	6	0,555	
MnBP	7	0,555	
MiBP	8	0,651	
5-oxo-MEHP	9	0,487	0,475
5-OH-MEHP	9	0,487	0,525
MBzP	10	0,720	
DEP	11	0,572	

Tableau 18 : PIP pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.

Enfin, l'application de la méthode BKMR à l'ensemble des polluants intégrés dans les analyses de l'effet cocktail n'a pas mis en évidence d'interaction significative entre les polluants comme présenté dans la figure 23.

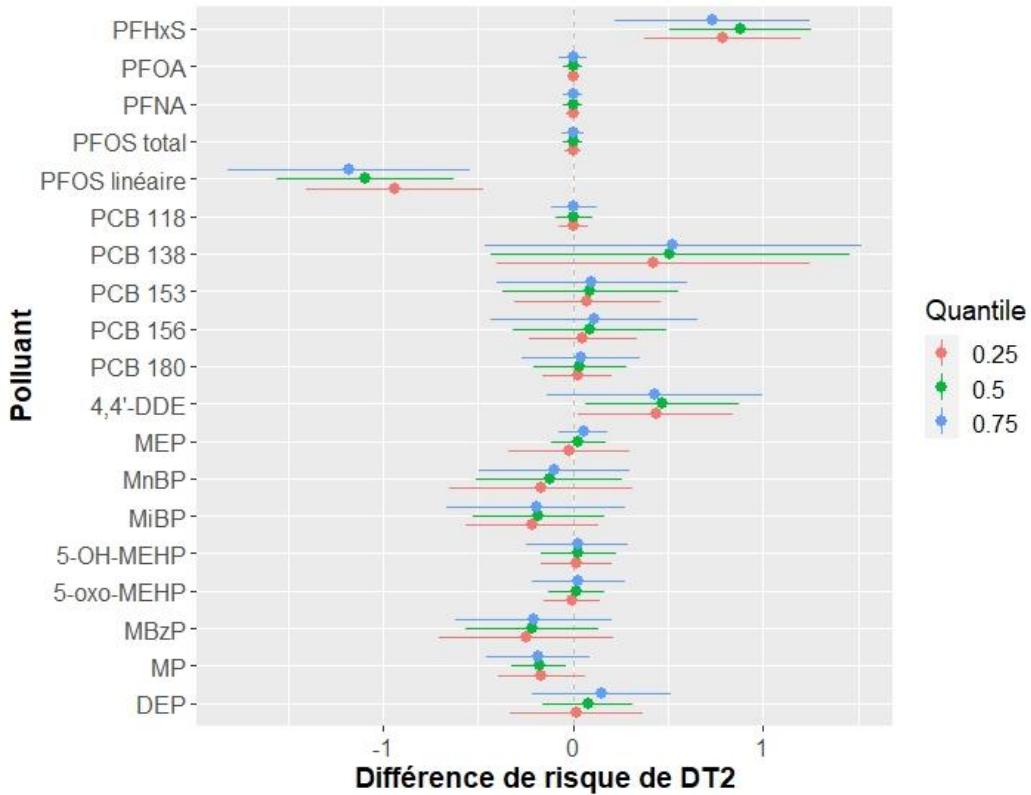


Figure 23 : Interactions entre les polluants pour le modèle BKMR incluant tous les polluants.

4.3.4.3 Comparaison des résultats statistiques

Le tableau 19 présente un récapitulatif des substances significativement associées au statut diabétique :

- Dans les modèles monopolluants ;
- Dans les modèles WQS (significativement associé au DT2 et poids supérieur à n^{-1}) ;
- Dans les modèles BKMR (la PIP est supérieure à 0,5).

	Modèles monopolluants	Modèles WQS en positif	Modèles BKMR
nPOP	-	DEP (+) ; MEP (+)	-
POP	PFHxS (+) ; PCB 138 (+) ; PCB 153 (+) ; PCB 156 (+) ; PCB 180 (+) ; 4,4'-DDE (+)	PFHxS (+) ; PCB 118 (+) ; PCB 180 (+) ; 4,4'-DDE (+)	PFHxS (+) ; PFOS L (-) ; Groupe PCB (+) ; 4,4'-DDE (+)
Ensemble des polluants	-	DEP (+) ; MEP (+) ; 5-OH-MEHP (+) ; PFHxS (+) ; PFOS TOT (+) ; PCB 118 (+) ; PCB 180 (+) ; 4,4'-DDE (+)	PFHxS (+) ; PFOS L (-) ; Groupe PCB (PCB 138) (+) ; 4,4'-DDE (+) ; MP (-) ; MEP (+) ; MnBP (-) ; MiBP (-) ; MBzP (-) ; DEP (+)

Tableau 19 : Comparaison des polluants mis en évidence comme significativement associés au diabète de type 2 par les différents modèles statistiques. (+) positivement associé au diabète, (-) négativement associé au diabète.

Deux substances sont significativement associées au diabète quel que soit le modèle statistique utilisé : le PFHxS et le 4,4'-DDE. Le groupe PCB est également positivement lié au DT2 quelle que soit l'approche statistique utilisée, néanmoins, les PCB individuellement corrélés à la pathologie varient un peu d'une méthode à l'autre, ce qui peut probablement s'expliquer par la corrélation importante des concentrations mesurées pour les différents PCB. Les trois approches statistiques convergeant vers la même conclusion, **nous considérons donc que l'association entre le PFHxS, le 4,4'-DDE et les PCB, et le diabète est démontrée de manière robuste dans notre étude.**

Pour les polluants urinaires, on peine à dégager une tendance et à identifier des nPOP liés à la maladie. Aucun polluant urinaire n'a montré d'association avec le diabète dans les modèles monopolluants. Le mélange de nPOP est positivement associé à l'incidence du DT2 dans le modèle WQS, mais pas par l'approche BKMR. Dans ce mélange, ce sont les : DEP, MEP et 5-OH-MEHP qui sont positivement liés au diabète par le modèle WQS. Cela est également suggéré (mais pas de manière franche) par le modèle BKMR tenant compte de l'ensemble des polluants. Cette divergence entre les résultats des modèles monopolluants et multipolluants est pour nous la démonstration de l'intérêt de l'approche multipolluant. En effet, certains polluants pourraient ne pas avoir un impact suffisant sur la pathologie pour être isolément statistiquement associés à celle-ci, en revanche, lorsqu'ils sont étudiés ensemble, leurs effets peuvent se renforcer jusqu'à devenir statistiquement significatifs. Notre degré de confiance dans l'association entre DEP, MEP et 5-OH-MEHP, et la pathologie est donc suffisant.

Le modèle BKMR regroupant tous les polluants montre également que plusieurs composés non persistants (le MP, le MnBP, le MiBP et le MBzP) et le PFOS linéaire présentent une relation inverse avec la pathologie. Mais cela n'est confirmé ni par les modèles monopolluants, ni par la méthode WQS, notre degré de confiance dans ces associations est donc faible et ces associations ne seront pas discutées ci-après.

La particularité de notre étude est de mettre en évidence l'effet cocktail non seulement entre les substances d'une même famille mais également entre substances de familles différentes et de profils toxicocinétiques différents.

Plusieurs équipes de chercheurs ont exploré les liens entre PFAS et diabète de type 2 avec, malheureusement, des résultats parfois contradictoires (214). Par exemple, dans une étude longitudinale menée sur 1237 femmes américaines âgées de 45 à 56 ans, le PFOA a été positivement et significativement associé à la survenue du diabète (147) alors que dans une autre étude longitudinale impliquant cette fois 248 Suédois adultes, le PFOA était négativement associé à la pathologie (132). Dans notre étude, parmi les PFAS, seul le PFHxS a été lié de façon robuste au diabète. Pour cette molécule, les données ne sont pas non plus consensuelles. D'une part, le PFHxS a été positivement associé au DT2 dans l'étude menée par Kang et Kim (2024) sur la grande cohorte nationale coréenne Korean National Health Survey (KoNESH) (191). Une association positive a été également mise en lumière dans les travaux de Park et al., (2022) portant sur la cohorte longitudinale de 1237 femmes américaines évoquée ci-dessus (147). Duan et al. (2021) ont aussi identifié une relation positive entre le PFHxS et le DT2, bien que cette relation semble non monotone puisqu'elle tend à disparaître pour des concentrations plus élevées de PFHxS (215). D'autre part, plusieurs travaux ont mis en avant des corrélations négatives, c'est ainsi le cas pour l'étude de Han et al., (2021) menée sur une cohorte de 151 diabétiques chinois et 153 contrôles appariés par l'âge (216). C'est également la conclusion des travaux de Conway et al., (2016) qui ont étudié le lien entre 4 PFAS et différentes formes de diabète (dont le DT2) dans une cohorte de plusieurs dizaines de milliers d'Américains exposés à de grandes quantité de PFOA via l'eau de distribution (217). Enfin, plusieurs travaux n'ont pas mis en lumière d'association entre ce polluant et la maladie (132,218,219). Au final, impossible de conclure actuellement sur l'impact réel du PFHxS sur l'épidémie mondiale de diabète, en cela nous rejoignons les conclusions de la méta-analyse de Gui et al. (2023) (220).

Dans la littérature, plusieurs études ont déjà rapporté des associations positives entre la contamination par le 4,4'-DDE et le DT2. Par exemple, dans l'étude prospective portant sur 793 paires cas-contrôle sélectionnées parmi les participantes de la grande cohorte américaine de la Nurses' Health Study (NHS) II, le 4,4'-DDE a été positivement associé au risque de DT2 (221). C'est également la conclusion de l'analyse de l'association entre l'exposition à plusieurs polluants persistants et le DT2 au sein des cohortes allemandes KORA et CARLA. Dans ces deux cohortes, Wolf et al. mettent en évidence une association positive entre l'exposition au 4,4'-DDE et le DT2 (222). En Algérie, Mansouri et Reggabi (2021) ont également identifié une relation positive entre la contamination par le 4,4'-DDE et le statut diabétique dans leur population de 181 paires cas-contrôle (223). Parallèlement à ce que nous avons observé dans notre étude, plusieurs travaux ont mis en évidence l'impact du 4,4'-DDE sur le DT2 individuellement mais également lorsqu'il est associé à d'autres polluants. Dans une population chinoise, le 4,4'-DDE était positivement associé au diabète par les modèles monopolluants et était identifié comme l'un des contributeurs principaux du modèle WQS utilisé dans cette étude (190). La même tendance a été observée dans la population de l'Anniston Community Heath Survey II. Au sein de cette population, une relation positive a été mise en évidence entre la contamination par le 4,4'-DDE et le DT2 à la fois en modèle monopolluant mais également par les modèles multipolluants, la méthode BKMR et la Quantile G computation (une méthode statistique proche de la méthode WQS) identifiaient le 4,4'-DDE parmi les composés principalement associés au risque de DT2 (224). A contrario, certains travaux comme celui effectué sur la cohorte française D.E.S.I.R., n'ont pas mis en évidence d'association positive entre la pathologie et le 4,4'-DDE (185). Il semble cependant, comme résumé dans la méta-analyse effectuée par Yipei et al. (2022) incluant au total 43 publications, que le 4,4'-DDE soit généralement positivement associé au diabète de type 2 (225). Les résultats observés dans notre étude rejoignent les conclusions de ce travail.

L'impact des PCB sur le diabète a été plusieurs fois investigué dans la littérature, cependant, les résultats des différentes études ne sont pas toujours cohérents (226). Ainsi, une étude portant sur 158 paires cas-contrôle chinoises appariées selon l'âge et l'endroit de résidence a rapporté que de nombreux PCB parmi lesquels les congénères 118, 138, 153, 156, 167 et 180, étaient positivement associés au diabète de type 2 (227). Ces données sont consensuelles avec une autre étude à plus grande échelle effectuée en Chine (228). Dans ce travail le lien entre la

contamination par les PCB et le DT2 a été évalué auprès de 1006 paires cas-contrôle dans la cohorte Dongfeng-Tongji, les résultats indiquent que tous les PCB étudiés sont positivement associés au DT2. Durant cette étude, les auteurs mettent également en évidence que l'association entre le PCB 153 et le DT2 serait non linéaire avec une forte augmentation du risque au-delà d'une concentration de 0,076 ng/mL. La tendance positive entre la contamination par les PCB et le risque de diabète est également observée dans une large population de 4498 volontaires âgés de 18 à 80 ans résidant dans les régions de Wuhan ou Zhuhai. Au sein de cette population, sept PCB, parmi lesquels les congénères 118, 138 et 153 augmentaient le risque de souffrir de la pathologie que ce soit en approche monopolluant ou en étudiant l'effet de la coexposition au moyen de la méthode BKMR (229). Dans les travaux de Tan et al. (2024), aucune association significative avec le DT2 n'était cependant mise en évidence pour le PCB 180. L'absence d'association pour certains congénères dans les études a déjà été rapportée plusieurs fois dans la littérature. Dans une population algérienne, seul le PCB 153 était associé au DT2 tandis qu'aucune association n'a été mise en évidence pour les PCB 138 et 180 (223). En Allemagne, Wolf et al., ont quant à eux rapporté que les PCB 138 et 153 étaient positivement associés au diabète tandis que le PCB 180 n'avait pas d'effet sur la pathologie (222). En association avec d'autres polluants persistants, la coexposition simultanée à plusieurs PCB et aux autres substances étudiées augmentait le risque DT2 (224). Certaines différences entre les congénères identifiés comme associés au diabète, pourraient venir de la forte corrélation entre les concentrations des PCB. Cependant, certains auteurs ont rapporté que la différence de structure entre les PCB pouvait influencer l'effet des différents congénères sur le risque de DT2. En effet, Gao et son équipe ont déclaré que les PCB étaient différemment associés au diabète selon qu'ils présentent une structure dioxine-like ou non ce qui induirait des mécanismes d'actions différents. En effet, les composés dioxine-like ont une affinité pour les récepteurs aryl d'hydrocarbone (AhR) et pourraient agir via ces récepteurs, ce qui n'est pas le cas des PCB non-dioxine-like (226). Il est difficile de conclure franchement sur l'impact des PCB sur le diabète pourtant les résultats de notre étude semblent indiquer une association globalement positive entre l'exposition aux PCB et le DT2. Malgré les résultats contradictoires rapportés dans la littérature, Gao et son équipe concluent qu'en tenant compte des expériences *in vitro* et *in vivo*, l'exposition aux PCB est un facteur de risque du DT2 (226).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé que des nPOP étaient liés à la pathologie avec l'approche monopolluant. Les modèles multipolluants renforcent les effets observés jusqu'à devenir statiquement significatifs pour plusieurs d'entre eux : un métabolite de pesticides organophosphorés le DEP, et deux métabolites de phtalates le MEP et le 5-OH-MEHP.

Quelques scientifiques se sont intéressés au lien entre l'exposition chronique aux pesticides organophosphorés avec le statut diabétique. La plupart des travaux portent sur des populations exposées professionnellement et par conséquent exposées à des niveaux de contamination bien différents de ce que nous pouvons retrouver dans la population générale. Récemment, une équipe de chercheurs menée par Guo a investigué le lien entre la contamination par les pesticides organophosphorés et le diabète de type 2 dans une population générale qui inclut les données de 6 593 participants de la cohorte américaine de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Leur travail met en évidence une association positive entre le DEP et le diabète de type 2 lorsque l'association est investiguée en approche monopolluant, cependant cette relation diminue avec l'augmentation des quartiles de contamination indiquant une possible tendance non monotone (230). Dans cette étude, l'investigation des effets cocktails montre une relation positive entre les concentrations en DAP et le DT2. Les modèles WQS et BKMR indiquent tous les deux que le composé principal des modèles est le DEP. Nous l'avons expliqué en introduction de cette thèse, les DAP sont des métabolites des pesticides organophosphorés. Une étude chinoise a déterminé les concentrations de 10 pesticides organophosphorés dans le plasma de 910 individus diabétiques de type 2, 910 individus souffrant de prédiabète et 914 individus contrôles provenant d'une population vivant en zone rurale. Leurs résultats montrent que plusieurs des pesticides étudiés sont individuellement associés au DT2 et que la coexposition au mélange de ces composés montre une relation positive avec le statut diabétique (231). Une méta-analyse publiée en 2023 a rapporté que l'exposition aux pesticides organophosphorés était positivement associée au DT2 (232). Cependant, cette étude n'incluait que 5 publications sur la thématique et ces travaux portaient sur des populations potentiellement exposées professionnellement (agriculteurs et leur famille, etc.). Pour pouvoir conclure sur l'effet des pesticides organophosphorés sur le diabète, nous devons avoir à disposition plus d'études, comme celle que nous avons réalisée, traitant de la problématique dans des populations non exposées professionnellement.

Deux métabolites des phtalates ont été associés positivement au DT2 dans nos investigations statistiques multipolluants : le MEP un métabolite du diéthylphtalate et le 5-OH-MEHP un métabolite du DEHP. Ces substances sont largement utilisées dans les biens de consommation et plusieurs équipes de recherche ont investigué leur lien avec le DT2. Une étude portant sur un total de 1 016 personnes âgées de 70 ans a mis en évidence que plusieurs métabolites des phtalates dont le MEP étaient positivement associés au DT2 (233). Deux ans plus tard, les données portant sur les deux grandes cohortes américaines NHS et NHS II rapportaient des résultats divergents entre les deux études. Les résultats portant sur la cohorte NHS II indiquaient une association positive entre l'exposition aux métabolites des phtalates et le DT2 et plus particulièrement pour les métabolites du DEHP (dont le 5-OH-MEHP), alors que ces associations n'étaient pas mises en évidence dans la cohorte NHS (234). La population chinoise est l'une des plus touchée par le DT2. Une étude transversale incluant 250 paires cas-contrôle recrutées parmi les patients et les travailleurs de l'université et d'un hôpital de Tianjin a mis en évidence plusieurs associations entre l'exposition aux métabolites des phtalates et le statut diabétique. Duan et son équipe ont notamment identifié le 5-OH-MEHP comme pouvant favoriser le DT2 (235). Dans une autre étude incluant 206 paires cas-contrôle vivant dans le sud de la Chine, les auteurs ont également mis en évidence que la coexposition à plusieurs métabolites des phtalates était positivement associée au DT2. Ceux-ci identifient notamment le 5-OH-MEHP parmi les composés les plus problématiques (236). En 2024, Wang et son équipe ont souligné que le MEP et le 5-OH-MEHP étaient parmi les métabolites associés au DT2 lors de l'évaluation de la coexposition à 64 métabolites des phtalates par les méthodes WQS et BKMR. Leurs modèles ont mis en évidence une augmentation du risque global de diabète par l'exposition aux phtalates dans leur population de 200 personnes âgées chinoises (237). Notre étude indique une augmentation du risque de diabète de type 2 en relation avec la contamination par des métabolites du diéthylphtalate et du DEHP. Ces données concordent globalement avec celles que nous avons retrouvées dans la littérature où le MEP et les métabolites du DEHP sont régulièrement associés au DT2. Une méta-analyse réalisée en 2022 indique que le 5-OH-MEHP et, de façon générale, les métabolites du DEHP sont positivement associés au DT2. Les auteurs mettent cependant en évidence l'absence d'association significative pour le MEP (238). Nos données tendent à confirmer les conclusions de cette étude qui indiquent une augmentation du risque de diabète en lien avec l'exposition aux phtalates et plus particulièrement aux phtalates de haut poids moléculaire comme le DEHP.

Dans notre étude, pour les autres composés urinaires, nous n'avons pas mis en évidence d'association significative avec la pathologie, cependant plusieurs autres études avaient déjà mis en évidences un lien entre le DT2 et la contamination par certains bisphénols (234,239–241) ou certains parabènes (183,242).

4.3.4.4 Analyse des résultats statistiques

Les mécanismes liant la contamination par les polluants environnementaux et le DT2 ne sont pas complètement élucidés. Néanmoins, les expérimentations *in vivo* chez l'animal et *in vitro* montrent que les POP (y compris les PFAS et les PCB), les phtalates et les pesticides organophosphorés peuvent altérer différents axes du métabolisme énergétique, comme l'adipogenèse et la glucogénèse (243,244). La perturbation de ces deux axes pourrait favoriser la survenue du DT2. Les mécanismes impliqueraient à la fois des récepteurs membranaires et nucléaires (128). Les récepteurs PPAR α et γ jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique et énergétique, les études ont montré que ces récepteurs pourraient être activés par les phtalates, les PFAS ou encore les pesticides organophosphorés (128,245). L'activation du récepteur AhR par certains PCB pourraient également avoir un impact sur le métabolisme énergétique avec, entre autres, des effets génomiques (128,226). Certains phtalates, dont le DEHP, perturberaient également le fonctionnement du transporteur GLUT 4 et sont, à travers cette activité, capables d'affecter l'absorption du glucose dans les cellules hépatiques ou musculaires (246). L'une des principales actions des pesticides organophosphorés est leur action sur l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est, entre autres, présente dans les cellules β pancréatiques sécrétrices d'insuline. Elle permet d'hydrolyser l'acétylcholine un neurotransmetteur impliqué dans la sécrétion d'insuline via les récepteurs muscariniques des cellules β . L'inhibition de cette enzyme par les OP perturbe donc la sécrétion d'insuline (247). Enfin, la plupart des substances étudiées provoquent également une augmentation du stress oxydatif dans l'organisme pouvant négativement impacter le fonctionnement des cellules productrices d'insuline (128). Il serait vain de vouloir lister l'ensemble des mécanismes d'interaction entre les polluants chimiques de l'environnement et le métabolisme du glucose ou le DT2 dans le cadre de ce travail, mais les données expérimentales couplées aux résultats d'études épidémiologiques indiquent un effet probable des PE sur le DT2. Il est intéressant de souligner que certains polluants ont des cibles communes comme les récepteurs PPAR, cela confirme l'importance d'évaluer l'effet cocktail lors des études épidémiologiques.

Le design de l'étude, les caractéristiques de la population et d'autres facteurs peuvent influencer les résultats obtenus et expliquer, du moins en partie, les discordances des résultats observés entre les différentes études.

Les populations diabétiques et saines étudiées dans ce travail ne sont constituées que d'une centaine d'individus chacune, ce qui peut s'accompagner d'une puissance statistique moindre et de plus larges intervalles de confiance. Ensuite, du fait des difficultés rencontrées pour le recrutement de la population contrôle, nous n'avons pas apparié les cas selon le sexe. De ce fait, il existe une disproportion certaine dans la répartition homme et femme entre nos deux sous populations. Même si elle n'est statistiquement pas significative (p -valeur > 0,05) et même si le sexe est introduit comme covariable dans tous les modèles, cette différence peut influencer les résultats. En effet, d'une part le DT2 a une prévalence plus importante chez les hommes que chez les femmes. D'autre part, le genre peut avoir un effet sur les niveaux de contamination pour différents polluants en raison de paramètres physiologiques imputés au sexe. Par exemple, les niveaux de contamination des PFAS sont en général moins élevés chez les femmes en raison des menstruations (23,208). Notre population étant âgée, nous ne pouvons également exclure l'impact de la grossesse et de l'allaitement sur les concentrations de plusieurs polluants persistants chez nos individus féminins (23). Pour les polluants mesurés dans l'urine, ce sont les différences au niveau du mode de vie qui peuvent induire une différence de contamination entre les deux sexes. Par exemple, l'utilisation plus fréquente de produits cosmétiques chez les femmes peut favoriser l'exposition aux polluants contenus dans ce type de produits tels que les parabènes (248,249). De plus, certaines études ont rapporté des associations différentes au sein d'une même cohorte entre l'exposition à certains PFAS et le DT2 en fonction du genre (218,250,251). Il aurait pu être intéressant de réaliser nos analyses statistiques en séparant hommes et femmes. Nous ne l'avons pas fait car, nous estimions, qu'étant donné notre population relativement petite, cela aurait trop drastiquement diminué la puissance statistique (216). Il faut également noter qu'une partie de nos volontaires sains a été recrutée parmi les donneurs de sang de la Croix-Rouge de Belgique. Or, donner son sang peut diminuer les concentrations de certains polluants comme les PFAS (252). Notons néanmoins que Gasiorowski et son équipe ont montré que la diminution des concentrations des PFAS était plus importante chez les sujets qui donnent du plasma (toutes les six semaines) par rapport aux volontaires qui donnent du sang complet (toutes les 12 semaines), chez ces

derniers, aucun changement significatif de concentration n'est observé pour le PFHxS (253). En Belgique, le don de sang total constitue deux tiers des dons faits à la Croix-Rouge, et la fréquence de don est rarement aussi élevée que dans l'étude de Gasiorowski, le risque de biais dans notre étude est donc limité (254). Il convient également de noter que, pour exclure un diabète de type 2 chez nos volontaires sains, nous nous sommes basés sur l'absence de diagnostic de diabète et sur la valeur de l'HbA1c (<6.5 %). Toutefois, le diabète de type 2 est souvent précédé d'un long état de prédiabète, caractérisé par des altérations du métabolisme du glucose et une insulino-résistance déjà présente. Le diagnostic de prédiabète repose sur une glycémie à jeun comprise entre 100 et 126 mg/dL ou une HbA1c située entre 5,7 % et 6,4 % (255). La médiane de l'HbA1c observée chez nos volontaires sains étant de 5,5 %, nous ne pouvons exclure que certains présentent une légère altération du métabolisme glucidique. Toutefois, seul un nombre restreint de volontaires non diabétiques présente une HbA1c supérieure à 5,7 % (n = 7), et aucun n'a une valeur supérieure à 5,9 %. L'impact potentiel de ce biais semble donc limité.

Une limitation importante de notre étude est son caractère transversal. Cela induit plusieurs difficultés. Premièrement, la contamination mesurée dans les échantillons au moment du recrutement ne correspond pas forcément à celle présente à la période où la pathologie s'est mise en place. D'autant plus que nous n'avons pas fixé de délai maximal entre le diagnostic du diabète et la participation à l'étude. Ceci est moins problématique pour les polluants persistants, on peut raisonnablement estimer que la concentration de ceux-ci dans le sang est stable ou, à tout le moins, fait l'objet d'une diminution régulière. En effet, on observe globalement une diminution des concentrations mesurées dans la population pour le 4,4'-DDE, les PCB ou les PFAS du fait des restrictions/interdictions et des campagnes de sensibilisation de ces dernières décennies. Des épisodes aigus d'exposition à ces polluants durant les dernières années sont donc peu probables (209). On peut donc raisonnablement considérer que les concentrations en POP mesurées dans notre étude sont représentatives des taux présents au moment du diagnostic de la maladie.

Par contre, certaines substances étudiées sont des composés dont la demi-vie biologique est courte. La mesure de leurs concentrations dans un seul échantillon urinaire reflète la contamination dans les quelques heures précédant le prélèvement plutôt que la concentration à long terme. Par conséquent cela peut conduire à des associations positives fortuites ou à

l'inverse, à l'absence d'association (161). Cependant, comme nous l'avons montré dans la publication 3, aujourd'hui, des alternatives fiables pour mettre en évidence la contamination par les polluants présentant une forte variabilité intra-individuelle ne sont pas encore identifiées (249). Néanmoins, l'ajustement des concentrations des polluants urinaires par la dilution urinaire comme appliqué dans notre étude et l'utilisation d'une population suffisamment grande permet de réduire, du moins en partie, l'impact de la variabilité intra-individuelle de ce type de composés sur les analyses statistiques (164).

Le caractère transversal de cette étude ne permet pas d'exclure un lien de causalité inverse entre la contamination et le statut diabétique (160). Des mécanismes biologiques en lien avec le diabète de type 2 ou des facteurs de risque de cette pathologie pourraient influencer les concentrations de certains polluants en modifiant leur bioaccumulation ou leur élimination (256). Ainsi, la diminution des concentrations de certains composés tels que les PCB ou le 4,4'-DDE est plus faible chez les individus diabétiques que chez les volontaires sains (256,257). Certaines caractéristiques des populations peuvent expliquer cette tendance. Par exemple, un IMC supérieur chez les individus diabétiques, comme observé dans notre étude, pourrait diminuer l'élimination des POP. Certains auteurs suggèrent également que l'obésité affecte le fonctionnement des cytochrome P450 et conduit à une diminution des capacités de métabolisations des xénobiotiques chez les individus obèses (258). Des changements dans les habitudes provoquées par le diagnostic du DT2 (notamment le changement de régime alimentaire) peuvent également impacter les concentrations des polluants (259). De plus, comme discuté ci-dessus, la prescription de médicaments hypocholestérolémiant peut exercer une influence sur les concentrations observées pour certains polluants.

Le diabète exerce également une influence sur la fonction rénale et donc sur l'élimination des polluants. La néphropathie diabétique est l'une des principales causes d'insuffisance rénale (260). Cette complication présente plusieurs stades : en premier lieu, on observe un état d'hyperfiltration glomérulaire. Survient ensuite une néphropathie latente caractérisée par une microalbuminurie réversible qui, si elle n'est pas prévenue, conduira au stade ultime de l'insuffisance rénale irréversible (260,261). De nombreux patients diabétiques présentent également une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) sans protéinurie (261). Par conséquent, l'état de la fonction rénale chez les patients diabétiques peut avoir divers effets en fonction du type d'atteinte rénale. Lors du stade de l'hyperfiltration, l'augmentation du DFG

peut accroître la quantité de polluants éliminés. En revanche, la diminution du DFG peut conduire à la réduction de l'excrétion des polluants et mener à l'augmentation de leurs concentrations sanguines (262). Au-delà d'un certain stade d'insuffisance rénale, le tissu rénal se dégrade et des phénomènes de passage de protéines dans l'urine s'ajoutent à la modification du DFG. Deux types d'atteintes du tissu rénal peuvent influencer la cinétique des polluants. Premièrement, les atteintes du tissu glomérulaire vont conduire à la macroprotéinurie et au passage de protéines comme l'albumine dans les urines, ce qui est l'une des complications fréquentes du diabète de type 2. Le corps tubulaire peut également se dégrader. Ce dernier est également impliqué dans la sécrétion et la réabsorption de certains polluants, modulées par des transporteurs saturables (263). Il est donc normal de se demander dans quelle mesure les altérations de la fonction rénale peuvent influencer les concentrations des polluants. Par exemple, les PFAS semblent avoir une relation suivant une courbe en U inversé entre leurs concentrations sériques et les atteintes de la fonction rénale (263). Aux premiers stades de l'atteinte rénale, les concentrations sanguines des PFAS augmentent du fait de la diminution du DFG. Dans les stades plus avancés, l'albuminurie va favoriser l'élimination du fait de la fixation de ces composés sur cette protéine. Cette hypothèse est confirmée par les données obtenues dans la cohorte NHANES, au sein de laquelle une corrélation négative entre le rapport albuminurie/créatinine urinaire et les concentrations sériques des PFAS a été rapportée (264). Cette association se renforce proportionnellement au stade de l'insuffisance rénale, indiquant, selon les auteurs, une augmentation de l'élimination des PFAS en lien avec leur liaison à l'albumine. Dans notre étude, pour les 66 patients diabétiques pour lesquels nous avons retrouvé une valeur numérique de l'albuminurie dans le dossier médical, nous avons testé les corrélations entre la concentration sérique des différents PFAS et l'albuminurie. Seule l'association entre le PFOS total et le rapport albuminurie/créatinine urinaire était significative ($r = -0,222$; $p\text{-value} = 0,0397$). Pour les PFAS, on peut également observer des altérations de leur sécrétion et de leur réabsorption dues aux atteintes tubulaires. En effet, ces molécules sont à la fois sécrétées et réabsorbées au niveau tubulaire par les transporteurs d'anions organiques (OAT) (263,264). Les atteintes tubulaires peuvent donc également modifier l'élimination des polluants dans les urines. L'état complet de la fonction rénale, en considérant le DFG, la protéinurie et les atteintes tubulaires, devrait être pris en compte dans les études épidémiologiques. Malheureusement, bien que certaines données aient été disponibles dans

le dossier médical des patients diabétiques, nous n'avons pas évalué la fonction rénale des volontaires non diabétiques et n'avons donc pas pu l'inclure dans nos analyses.

Dans nos travaux, nous avons comparé différentes méthodes d'ajustement des concentrations de polluants urinaires. Nous avons d'emblée écarté l'utilisation de l'osmolalité ou de la gravité spécifique en raison du biais que la présence de glucose dans les urines chez les patients diabétiques peut induire sur ces méthodes. Nous avons choisi d'utiliser la standardisation ajustée par covariables basée sur la créatinine urinaire, car celle-ci semble plus adaptée dans le cas du diabète (183). Cette méthode permet de tenir compte en partie de facteurs individuels associés à la valeur de la créatinine, tels que l'IMC, l'âge et le sexe, mais pourrait être enrichie en intégrant d'autres paramètres comme les habitudes alimentaires (182,183). Cependant, l'ajustement par des méthodes basées sur la créatinine pourrait également être biaisé par les paramètres inhérents à la fonction rénale des volontaires. La créatinine urinaire provient principalement, comme nous l'avons expliqué, de la clairance de la créatinine plasmatique, mais aussi en partie d'une sécrétion tubulaire qui peut considérablement influencer la valeur mesurée de la créatinine urinaire chez des sujets souffrant de néphropathies protéinuriques, comme c'est souvent le cas chez les individus diabétiques (265). Cela plaide pour une inadéquation de l'ajustement des concentrations mesurées des polluants par la créatinine urinaire ou ses modèles dérivés. Néanmoins, à l'heure actuelle, cette méthode reste celle préconisée par rapport à la gravité spécifique ou l'osmolalité (183). Une alternative à ces méthodes pourrait se trouver dans l'adaptation des concentrations urinaires par la cystatine C, produite de façon constante par les noyaux cellulaires et filtrée librement sans sécrétion tubulaire (265).

Un autre facteur pourrait influencer les concentrations de polluants mesurées dans le sérum et l'urine : la consommation de médicaments par les volontaires. Que les sujets soient diabétiques ou non, la prise de certains médicaments, par exemple des statines, peut, influencer le taux de lipides sérique, altérant ainsi la cinétique des polluants lipophiles dans l'organisme (266). Par ailleurs, l'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou de diurétiques, fréquemment utilisés chez les patients diabétiques, peut modifier la fonction rénale, réduisant la clairance rénale des polluants excrétés par voie urinaire (267–269). Ces interactions pharmacocinétiques également observées pour de nombreux autres médicaments suggèrent que les traitements médicamenteux pourraient

biaiser les niveaux mesurés de polluants (270). Bien sûr, la liste des médicaments pouvant influencer les concentrations des polluants dans l'organisme est longue. La collecte systématique des données sur les traitements médicamenteux des volontaires permettrait d'ajuster les modèles statistiques, d'atténuer ce biais potentiel, et d'affiner l'interprétation de l'exposition réelle dans les études épidémiologiques.

Comme discuté dans l'introduction de ce chapitre, les études épidémiologiques sont toutes soumises à des limitations et le protocole parfait n'existe pas (même pour les études longitudinales). Déterminer avec certitude le poids de la pollution environnementale sur la rapide augmentation de l'incidence du diabète passe donc par la réalisation de multiples études épidémiologiques impliquant des populations différentes à travers le monde. Notre travail s'inscrit dans cette démarche et viendra s'ajouter à la somme des données existantes. La grande force de notre étude et son originalité est la prise en compte de l'effet cocktail. Nous avons mesuré dans le sang et l'urine la contamination par un grand nombre de polluants différents issus de familles chimiques différentes. De nouveau, nos efforts sont imparfaits. Si le panel de composés mesurés et étudiés dans notre travail est certainement l'un des plus larges actuellement dans la littérature pour le diabète de type 2, en raison de moyens et de temps limités, nous n'avons pas exploré certaines familles de polluants potentiellement liés au DT2 comme les retardateurs de flamme bromés, les pyréthrinoïdes, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc. Le choix des méthodes statistiques et la façon dont nous les avons utilisées et/ou paramétrées peuvent également être discutés. Par exemple, La réalisation d'un *directed acyclic graph* (DAG), un outil permettant de visualiser les relations causales supposées entre différentes variables, aurait pu nous aider à mieux identifier les facteurs de confusion à inclure dans les modèles, et ainsi affiner les analyses statistiques (271,272). En tenant compte des paramètres discutés précédemment, le DAG aurait pu être représenté sous la forme montrée à la figure 24. Celle-ci met en évidence des rétroactions, plus difficiles à modéliser, qui nécessitent des méthodes statistiques spécifiques avancées (273,274). Ces rétroactions montrent néanmoins une limitation de notre étude et devraient être prises en compte dans de futurs travaux, ainsi que d'autres covariables potentielles. Les biais liés à différents facteurs de notre recherche pourraient être partiellement atténués par une étude prospective, incluant le recrutement de volontaires diabétiques ou non avec une fonction rénale saine, ainsi que de contrôles traités par statines.

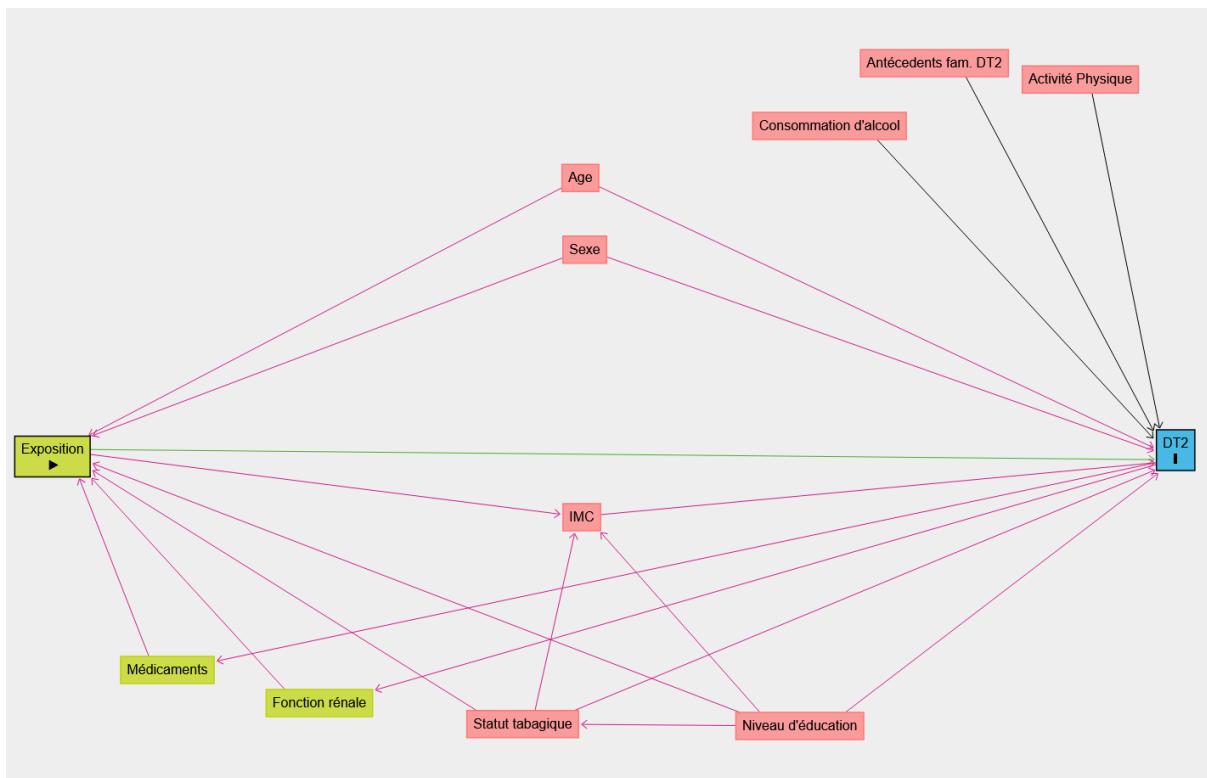


Figure 24 : DAG de l'étude incluant la fonction rénale et les médicaments (DAGitty)

De plus, nombreuses méthodes statistiques destinées à explorer l'effet cocktail existent dans la littérature, nous en avons choisi deux, qui, si elles présentent chacune des faiblesses, nous paraissaient complémentaires, ce qui gomme en partie ces faiblesses. La méthode WQS est relativement performante même sur un petit jeu de données, facile à interpréter et n'est pas sensible aux outliers puisque les données sont catégorisées en quantiles, mais cette méthode ne permet pas de mettre en évidence des effets non monotones ou des interactions non additives entre polluants. La méthode BKMR est, quant à elle, plus difficile à modéliser et à interpréter. Notamment, nous avons dû appliquer une transformation logarithmique sur nos données avant de les centrer et réduire, car la méthode est sensible à la normalité et la dispersion des données. L'identification des molécules importantes dans le modèle BKMR est également délicat, nous avons choisi d'utiliser un seuil de 0,5 pour les PIP mais ce seuil, bien que couramment employé dans la littérature (205,275–277), est un choix quelque peu arbitraire qui, à notre connaissance, n'a jamais démontré être le meilleur choix. Néanmoins, la méthode BKMR permet de mettre en évidence des associations non monotones et d'éventuelles interactions non additives entre les composants du cocktail. Nous pensons donc, qu'actuellement, la combinaison de ces deux méthodes est un outil statistique performant pour étudier l'effet cocktail.

4.3.5 Conclusion

Notre étude cas-témoins s'ajoute à l'ensemble de la littérature investiguant les associations entre les perturbateurs endocriniens et le DT2. Nous avons observé que l'ajustement des concentrations des polluants sériques pouvait avoir un impact significatif sur les résultats. Différents composés ont été identifiés pour leur lien avec le statut diabétique, suggérant une augmentation du risque de diabète en fonction de leur concentration : plusieurs PCB, le 4,4'-DDE, le PFHxS, le DEP, ainsi que deux métabolites des phtalates, le MEP et le 5-OH-MEHP. L'investigation de l'effet cocktail au moyen des méthodes WQS et BKMR nous a permis de mettre en évidence l'association positive entre la coexposition simultanée à plusieurs polluants et le DT2. Nos résultats démontrent l'importance de ne pas se limiter à l'approche monopolluant et d'évaluer les effets cocktails sur le DT2 en incluant notamment des substances de profils toxicocinétiques différents. Or, l'effet conjoint de l'exposition aux polluants environnementaux est encore peu étudié dans la littérature.

Malgré les limitations liées à la taille de l'échantillon et au caractère transversal de l'étude, notre travail contribue à la compréhension des effets des polluants environnementaux sur le DT2. Il souligne la nécessité de poursuivre les travaux de recherche pour évaluer les risques associés à l'exposition aux polluants environnementaux en incluant : de plus larges populations, un design prospectif, un plus grand nombre de substances et la prise en compte d'un maximum de paramètres pouvant influencer les concentrations de certains polluants que nous avons discutés dans ce travail.

Chapitre 5. DISCUSSION

Établir un lien de causalité entre le DT2 et les perturbateurs endocriniens au moyen d'une seule étude épidémiologique est impossible. Ainsi, la mise en évidence du lien potentiel entre l'augmentation de l'incidence du DT2 et la contamination par les polluants chimiques de l'environnement suspectés d'être perturbateurs endocriniens est un processus complexe qui repose sur l'accumulation de données *in vitro*, *in vivo* chez l'animal et épidémiologiques, obtenues au moyen de méthodologies robustes. Dans ce travail, nous avons voulu contribuer à cette thématique en se focalisant sur deux aspects principaux : d'une part, nous avons cherché à optimiser la façon de déterminer l'exposition aux composés non persistants et deuxièmement, nos efforts ont porté sur l'évaluation de l'effet de la coexposition simultanée à plusieurs substances différentes sur l'incidence du DT2.

A travers notre travail de revue de la littérature sur la pollution et le DT2 (chapitre 1.4) présenté dans la publication 1, nous avons réalisé que de nombreuses substances incriminées pour leur action sur le métabolisme glucidique sont des polluants dont la demi-vie biologique est courte et donc des polluants non persistants. L'une des principales limitations des études épidémiologiques visant à mettre en évidence un lien entre ce type de substances et un effet sur la santé est la difficulté, en l'état actuel des connaissances scientifiques, à évaluer correctement la contamination au long terme pour ce type de composés. En effet, la littérature montre que pour de nombreux polluants non persistants, la concentration mesurée dans un seul échantillon urinaire, dans un pool de multiples prélèvements ou même dans des urines de 24 heures ne permet pas représenter correctement la contamination au long terme. Nous avons débuté nos travaux par l'investigation d'une solution pour mettre en évidence la contamination chronique par les polluants non persistants.

Nous avons choisi d'investiguer l'utilisation du cheveu comme matrice pour le dosage de ces polluants environnementaux. Cette matrice, utilisée depuis de nombreuses années en toxicologie médico-légale et clinique, possède la particularité de pouvoir fixer les xénobiotiques pour une longue durée et permettrait d'évaluer l'exposition à plus long terme (167). Le laboratoire ne disposant pas encore de méthode analytique pour le dosage des polluants non persistants dans les cheveux, notre première contribution a été l'adaptation et la validation d'une méthode analytique permettant de doser simultanément trois parabènes, deux bisphénols et huit PFAS dans les cheveux. Etant donné qu'aucune étude n'avait encore mesuré les niveaux de contamination de ces polluants dans les cheveux d'une population

vivant en région liégeoise, nous avons échantillonné 114 individus, sans exposition professionnelle particulière, recrutés en Province de Liège. Ce travail a permis de mettre en évidence que les PFAS étaient très peu détectés. Seul le PFOA a été quantifié dans 46,4 % des échantillons capillaires et ce, malgré une sensibilité de la méthode adaptée aux concentrations que l'on pouvait attendre dans notre population sur base des données de la littérature (173). En revanche, plus de 90 % des volontaires présentaient des quantités mesurables de BPS et BPA dans leurs cheveux et les parabènes ont été mesurés dans 54,8 % à 94,7 % des échantillons. Nous n'avons pas mis en évidence de différences des niveaux de contamination pour les différents polluants en fonction des paramètres étudiés comme la longueur des cheveux ou l'application de traitements capillaires (coloration/décoloration). Nous avons cependant identifié une différence entre les hommes et les femmes principalement pour le PrP. Les concentrations en parabènes mesurées dans certains échantillons présentaient des valeurs extrêmes, jusqu'à 100 fois la valeur de la médiane observée dans la population. Ces fortes contaminations sont probablement dues à l'utilisation de produits cosmétiques capillaires tels que des cires ou des gels contenant ce type de molécules. Cela montre également que les procédures de décontamination classiques ne suffisent pas toujours à éliminer toute la contamination externe pouvant dès lors biaiser les résultats obtenus, ce qui est un premier frein à l'utilisation de cette matrice.

Afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation du cheveu pour le biomonitoring de polluants environnementaux, il est également indispensable de savoir dans quelle mesure le cheveu reflète effectivement la contamination interne de l'organisme. A cet effet, nous avons étudié la relation entre les concentrations retrouvées dans le cheveu avec celles que l'on retrouve dans les matrices habituellement utilisées pour évaluer la contamination des organismes par les xénobiotiques : l'urine et le sérum. Pour ce faire, nous avons mesuré chez 30 volontaires les concentrations de plusieurs composés persistants (8 PFAS et 6 PCB) dans les échantillons sériques et capillaires, et de certains polluants non persistants (2 bisphénols et 3 parabènes) dans les échantillons d'urine et de cheveux. Nous avons comparé le profil de contamination par famille entre les différentes matrices. Il est ainsi apparu que, le PCB 153 était à la fois le PCB prédominant dans les cheveux et dans le sérum. Parmi les parabènes, le PrP est le composé le moins souvent mesuré dans les deux matrices et le MP le composé prédominant. Pour les bisphénols et les PFAS, les profils de contamination différaient fortement entre les

matrices. Ensuite, nous avons employé trois méthodes statistiques différentes pour évaluer les corrélations entre les matrices et l'accord entre les niveaux de contamination mesurés dans celles-ci. Nos résultats ont montré que les niveaux de contamination n'étaient comparables que pour le PCB 180 (un PCB hautement substitué par des atomes de chlore) et certains parabènes (principalement l'EP, et le PrP dans une moindre mesure). Nous nous attendions à l'absence de corrélation entre les matrices pour les bisphénols du fait de la forte variabilité intra-individuelle des concentrations urinaires et de la différence entre la fenêtre d'exposition couverte entre le cheveu et un échantillon urinaire. En revanche, l'absence de corrélation et les faibles fréquences de détection pour certains composés comme les PFAS étaient plus surprenantes. En général, on considère que l'incorporation des polluants dans le cheveu depuis le sang est principalement influencée par la concentration du composé et le temps de contact entre les deux matrices (171,278). D'une part, les PFAS ont été mesurés dans un grand nombre d'échantillons sériques des participants de l'étude, avec des concentrations largement supérieures à celles des PCB par exemple. D'autre part, ces substances appartenant à la catégorie des polluants persistants, les concentrations sanguines de ces polluants diminuent lentement ce qui devrait permettre aux polluants de s'incorporer dans le cheveu. Les faibles fréquences de détection pour ce type de composés, ainsi que l'absence de corrélation entre les matrices pour le PFOA nous font penser que d'autres paramètres que la concentration et le temps de contact impactent significativement l'incorporation des polluants dans les cheveux. Par exemple, comme nous l'avons déjà abordé dans nos travaux, les PFAS sont des molécules fortement liées aux protéines plasmatiques (279). Cette affinité pourrait limiter leur transfert vers la racine capillaire.

Actuellement, le cheveu constitue une approche élégante pour le biomonitoring, offrant de nombreux avantages. Le caractère non invasif du prélèvement des échantillons permet effectivement de toucher un public plus large en incluant par exemple les enfants (167,168). L'effet mémoire de cette matrice devrait en théorie permettre de mettre en évidence la contamination sur plusieurs semaines, plusieurs mois, voire sur plusieurs années. On devrait ainsi obtenir une réduction de la variabilité intra-individuelle pour certains nPOP. Faÿs et al. (2022) ont mis en évidence une meilleure reproductibilité entre des dosages répétés de plusieurs polluants dans les cheveux de 16 volontaires par rapport à la variabilité observée dans les échantillons urinaires. Dans leur étude, l'ICC du BPS pour les concentrations établies

dans les cheveux était de plus 0,60 contre moins de 0,20 pour les concentrations mesurées dans l'urine (165). Le cheveu pourrait donc, théoriquement, être utilisé pour l'investigation de relations entre la contamination par les polluants environnementaux et leurs effets sur la santé. C'est ainsi que certains auteurs ont mis en évidence plusieurs associations entre les niveaux de contamination dans le cheveu et les risques cardiovasculaires ou l'obésité (280).

Cependant, de nombreuses limitations affectent l'usage du cheveu. Tout d'abord, la contamination externe représente un défi de taille dans l'utilisation de cette matrice, puisque les procédures de décontamination ne permettent pas d'éliminer totalement et exclusivement la contamination externe provenant notamment des poussières de l'environnement, des produits de soins capillaires ou d'une incorporation à partir des glandes sébacées (171). Nous avons d'ailleurs montré, dans notre première étude sur le cheveu, que cette limitation pouvait entraîner des conséquences directes sur les concentrations observées pour plusieurs parabènes. Plusieurs solutions pourraient être envisagées pour pallier ce problème, comme la mesure des métabolites de composés dans cette matrice. Différents métabolites des phtalates ont été retrouvés dans les échantillons capillaires de 100 femmes grecques, ce qui permet de mettre directement en lien les concentrations capillaires avec la contamination interne de l'organisme (281). Néanmoins, d'autres difficultés apparaissent en mesurant les métabolites plutôt que le composé parent. Les propriétés physico-chimiques des polluants sont influencées par la métabolisation, ce qui entraîne des conséquences sur leur incorporation dans les cheveux. Ainsi, les métabolites sont potentiellement moins incorporés dans les cheveux, car ils sont éliminés rapidement et sont moins lipophiles que les composés parents (282). De plus, mesurer le composé parent permet de déterminer directement les concentrations du composé qui est généralement la forme active dans l'organisme. Par exemple, on estime que pour les bisphénols, la glucuro- ou la sulfoconjugaison de la molécule mère diminue drastiquement les effets perturbateurs endocriniens de la molécule (53). La mesure directe du polluant pourrait ainsi être plus adaptée d'un point de vue toxicologique. La solution à la problématique de la contamination externe viendra peut-être de méthodes permettant de différencier directement la localisation des concentrations des polluants dans le cheveu afin d'établir la provenance de la contamination, interne ou externe. Par exemple, en 2019, Erne et al. ont proposé une méthode basée sur la désorption laser permettant de

différencier si les xénobiotiques avaient été incorporés depuis le sang ou s'il s'agissait de contamination externe adsorbée dans les structures superficielles du cheveu (283).

A ce jour, une autre limitation importante de la matrice capillaire est l'absence de contrôles de qualité commerciaux pour le dosage de polluants environnementaux dans le cheveu, ce qui ne permet pas de garantir la justesse des méthodes analytiques. Afin de valider les séries d'analyses, les scientifiques ont recours à des échantillons spikés en présence ou non de matrice « blanche ». Cependant, l'analyse d'une matrice blanche après l'ajout *a posteriori* et externe de concentrations connues de molécules d'intérêt ne permet pas de représenter parfaitement le processus d'extraction de composés présents à l'intérieur de la matrice, l'exactitude de la méthode analytique n'est donc pas parfaitement garantie.

Au total, les limitations actuelles, tant du point de vue de l'incorporation des polluants environnementaux dans cette matrice, de la contamination externe que du manque de matériel de référence, dépassent, selon nous, les avantages du cheveu dans le biomonitoring.

Ainsi, dans la dernière partie de cette thèse, nous avons mesuré les concentrations sériques et urinaires de polluants dans une population de patients diabétiques (de type 2) et une cohorte contrôle. Nos travaux ont mis en évidence que plusieurs polluants, principalement des polluants persistants, étaient individuellement associés à un risque accru de diabète de type 2. Cependant, l'un des objectifs principaux de notre travail était de mettre en évidence l'effet cocktail des polluants sur le diabète. La réalité de l'action additive ou synergique de la coexposition simultanée à plusieurs polluants environnementaux est bien documentée. Pour le diabète par exemple, comme nous l'avons discuté précédemment, certaines molécules agissent sur des cibles communes dans l'organisme comme les récepteurs PPAR, leurs effets vont alors probablement s'additionner. Les xénobiotiques peuvent également produire des effets sur un système endocrinien par des voies physiologiques différentes (perturbation de la structure ou de la physiologie des cellules β productrices d'insuline, augmentation du stress oxydatif, etc.), des effets synergiques sont alors à craindre. Il est donc important de ne pas se limiter à une approche statistique polluant par polluant. Cependant, les données liant l'exposition aux cocktails de polluants avec le DT2 sont encore peu nombreuses et seules quelques études ont investigué cette question se focalisant généralement uniquement sur une famille de substances chimiques. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été faits afin de mettre en place des méthodes statistiques robustes pour évaluer l'effet de la coexposition

à différents polluants. Ainsi, les scientifiques ont aujourd’hui à leur disposition un certain nombre de méthodes statistiques permettant d’évaluer l’action synergique des PE (284). Nous avons dans un premier temps utilisé la méthode WQS. Développée en 2015, celle-ci permet d’évaluer l’effet d’un mélange de polluants et d’identifier les composés de plus grande importance au sein de ce mélange. Cette méthode a été utilisée de nombreuses fois dans la littérature, ce qui nous permet de bénéficier d’une documentation fournie ainsi que d’une méthodologie bien décrite. Au moyen de cette méthode, nous avons mis en évidence que les mélanges des polluants sériques, des polluants urinaires et de tous les polluants étaient positivement associés au diabète de type 2 et nous avons également pu identifier plusieurs « bad actors » parmi les polluants étudiés. Cependant, cette méthode ne permet de répondre qu’en partie à l’investigation de la toxicité des PE, en effet, elle ne permet de mettre en évidence que des associations monotones et des interactions additives unidirectionnelles entre les polluants. Afin de compléter l’investigation des effets de la coexposition aux PE sur le diabète de type 2, nous avons utilisé une autre méthode, la méthode BKMR. Celle-ci nous a permis de mettre en évidence que le mélange de polluants sériques et le cocktail de tous les polluants étaient associés au statut diabétique. Cependant, en comparaison à la méthode WQS, les modèles bayésiens sont plus compliqués à mettre en place et à interpréter. Cela se traduit d’ailleurs dans la littérature, si de nombreux auteurs ont déjà eu recours à la méthode BKMR pour explorer les liens entre exposition à une pollution et marqueurs de santé, la façon de préparer les données en amont de l’analyse, de paramétriser le modèle ou de présenter les résultats est loin d’être consensuelle. Par exemple, certains auteurs appliquent une transformation logarithmique sur les données (276,285,286), d’autres les centrent et réduisent uniquement (205) et d’autres encore (comme nous) appliquent une combinaison de ces deux méthodes (287–289). Afin de pallier les problèmes de la colinéarité entre les polluants, il est recommandé de grouper certains polluants entre eux. Mais la sélection des groupes est ici aussi encore effectuée différemment en fonction des études, certains intègrent tous les polluants séparément dans leurs modèles (275), d’autres se basent sur les familles chimiques (290,291) et certains, comme nous l’avons fait, établissent les groupes en fonction d’un seuil de corrélation (ce seuil pouvant également varier d’une étude à l’autre) entre les polluants (205,287,289). L’interprétation des résultats n’est pas encore non plus totalement définie, notamment concernant l’interprétation des PIP qui permettent d’identifier les composés les plus importants dans les modèles statistiques comme nous l’avons discuté au chapitre 4.1.4.3.

Comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises, les données épidémiologiques issues de la littérature sont souvent contradictoires et il est dès lors difficile d'en tirer des conclusions définitives. La puissance des résultats naît de la diversité des études : si des résultats similaires sont obtenus dans différentes populations et avec différents designs d'étude, cela renforcera les conclusions sur l'impact ou non des PE sur le diabète de type 2. S'il faut diversifier les designs et les populations étudiées, mettre en place une certaine harmonisation entre les études pour certains paramètres est néanmoins souhaitable. Nous avons déjà mentionné plus haut le fait que la méthode statistique BKMR était employée de façon parfois très différente selon les auteurs mais il est également nécessaire de standardiser la façon de prendre en compte les facteurs confondants dans les études. Par exemple, nous avons vu que l'ajustement des méthodes de dosage peut avoir un effet significatif sur les résultats observés. Dans notre étude, nous avons comparé plusieurs méthodes d'ajustement des concentrations par la créatinine pour les polluants urinaires et par les lipides totaux pour les polluants sériques. Nous avons ainsi mis en évidence que les méthodes d'ajustement avaient un impact significatif sur certains résultats, ce qui est confirmé par plusieurs auteurs dans la littérature (183,185). Dès lors, une harmonisation des méthodes à utiliser entre les études serait bénéfique. De la même manière, nous constatons que les études n'incluent pas toutes les même covariables. En effet, certains auteurs n'intègrent qu'un faible nombre de covariables dans les modèles statistiques, ce qui complique la comparaison des résultats des différentes études. Nous pensons qu'il est nécessaire d'inclure dans les modèles les covariables reconnues comme facteurs de risque de la pathologie. A cette fin, les représentations graphiques comme les DAG, réalisées avec la collaboration d'équipes interdisciplinaires qualifiées, devraient être utilisées de manière systématique (271,272).

Une harmonisation des protocoles à l'échelle nationale, voire continentale favoriserait donc une diminution de la variabilité entre études et permettrait une meilleure comparaison des études entre elles. Une vision à long terme et un dialogue entre les acteurs dans différents pays sont nécessaires. Ces dernières années, le programme HBM4EU, qui a pris fin en juin 2022, a grandement contribué à l'harmonisation des méthodes de biomonitoring et à une mise en commun des données portant sur le biomonitoring humain de polluants environnementaux entre 24 pays membres de l'Union Européenne et 4 pays extérieurs. L'utilisation du biomonitoring humain n'a pas encore atteint son plein potentiel pour faciliter

une approche intégrée dans la mise en évidence du risque lié à la contamination chimique. Heureusement, cet effort va se poursuivre grâce au développement du programme « Partnership for the Assessment of Risks From Chemicals » (PARC) (292,293). Ce programme, qui comprend des acteurs de la toxicologie environnementale de 29 pays, vise à développer une approche commune au niveau européen pour l'évaluation de la toxicité des polluants environnementaux. Il fournit notamment des lignes directrices pour les différentes limitations, que ce soit au niveau du biomonitoring, de l'évaluation des risques liés à l'exposition aux polluants environnementaux, de l'évaluation des effets cocktails, et met à disposition des scientifiques de nouveaux outils pour mettre en évidence la toxicité des substances chimiques. L'un des autres objectifs de cette initiative est de rendre les données épidémiologiques plus accessibles et standardisées entre les pays européens (« Findable, Accessible, Interoperable and Reusable »). Grâce à de telles initiatives, nous pouvons espérer une standardisation des données épidémiologiques, ce qui permettrait de fournir des résultats robustes et faciliter la comparaison entre les différentes études (293). *In fine*, cela permettrait aux scientifiques de tirer des conclusions plus concrètes concernant l'incidence de l'exposition aux PE sur l'Homme et notamment sur le lien entre PE et DT2.

Chapitre 6. PERSPECTIVES

Les travaux qui font l'objet de cette thèse nous ont permis de répondre en partie aux questions que nous avions fixées dans nos objectifs portant sur l'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens sur l'incidence du DT2, mais de nombreuses interrogations subsistent.

Par exemple, nous avons mis en lumière certaines limitations liées à l'utilisation du cheveu comme matrice. Pour surmonter ces difficultés, il sera nécessaire de réaliser des études impliquant un grand nombre d'échantillons et des approches statistiques différentes. Pour les polluants non persistants, il faudrait tenter de corrélérer les niveaux de contamination calculés au moyen de plusieurs prélèvements collectés chez un même individu (au lieu d'un prélèvement ponctuel) avec la concentration capillaire. La validation de méthodes efficaces et standardisées pour la décontamination des échantillons de cheveu constituerait un progrès majeur qui favoriserait l'emploi de cette matrice. Enfin, la mise en place d'un programme de contrôles de qualité permettant une meilleure reproductibilité des résultats entre les laboratoires est également nécessaire.

Pour certaines familles de polluants comme les POP, le prélèvement sanguin apparaît toujours comme la matrice la plus adaptée. Le problème majeur de cette matrice est le caractère invasif du prélèvement pouvant diminuer la participation aux études et augmenter les coûts de celles-ci du fait du besoin d'un personnel habilité pour réaliser le prélèvement. Pour diminuer l'impact du caractère invasif du prélèvement, des avancées récentes ont été faites dans l'utilisation de dispositifs comme les « volumetric absorptive microsamplers » (VAMS) ou d'autres dispositifs de prélèvement sur goutte de sang séchée (Capitainer®B) qui évitent le recours à la prise de sang (294,295). Le dosage de polluants environnementaux devra être validé sur ce type de matériels. Pour les nPOP, la variabilité intra-individuelle des concentrations urinaires de ces composés ou de leurs métabolites rend difficile l'évaluation de la contamination au long terme par ces substances, et comme nous l'avons discuté peut biaiser les résultats des analyses statistiques. Nous avons investigué plusieurs méthodes d'ajustement des concentrations urinaire qui permettrait de diminuer en partie cette variabilité. Cependant, à l'avenir, il serait également opportun de considérer l'utilisation de méthodes de normalisation post-acquisition des données comme la « quality control based robust LOESS signal correction », la « MS total useful signal » et « probabilistic quotient normalization » pour réduire l'impact de la variabilité des concentrations. En effet, l'utilisation de telles méthodes, combinée à l'ajustement de la dilution pré-acquisition (comme l'ajustement par la créatinine

urinaire), a montré une meilleure correction de la variabilité intra-individuelle par rapport à l'utilisation des méthodes pré-acquisition seules (296).

Lors de nos investigations pour explorer l'effet cocktail, nous avons employé deux méthodes statistiques différentes (les méthodes WQS et BKMR). Notre choix s'est porté sur ces deux outils car ils nous semblent complémentaires. Néanmoins, ces deux méthodes ne sont pas les seules disponibles et de nombreux auteurs ont choisi d'utiliser d'autres approches. Même parmi les utilisateurs des modèles BKMR, il existe une grande variété dans la paramétrisation des modèles et dans la présentation et l'interprétation des résultats. Une certaine homogénéisation des méthodes statistiques utilisées pour explorer l'effet cocktail nous semble donc souhaitable. Cependant, nous nous réjouissons que ce genre d'évolution soit l'un des objectifs du projet PARC visant au développement et à l'homogénéisation des méthodologies pour évaluer l'impact des polluants environnementaux et notamment de la coexposition aux mélanges de polluants (293).

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence au sein de notre population, l'impact possible de plusieurs polluants de l'environnement sur l'incidence du diabète de type 2. Cependant, en tant que professionnels de santé, nous pouvons également nous demander quel est l'impact des perturbateurs endocriniens sur la physiopathologie du diabète, sur l'efficacité du traitement ou sur les complications de cette pathologie. Cette question est d'autant plus importante qu'elle pourrait potentiellement influencer directement la qualité de vie des patients. Les données sur cette thématique sont peu nombreuses. On a par exemple montré chez la souris que le PFOS pouvait interagir avec les mécanismes améliorant la tolérance au glucose et perturber le mode d'action de la metformine, l'un des médicaments les plus utilisés dans le traitement du DT2 (297). Certains PE comme les PFAS et les phtalates, peuvent interagir avec les récepteurs PPAR. Dans le traitement du DT2, ces récepteurs sont la cible des glitazones, une famille de molécules qui visent à diminuer la résistance à l'insuline et à améliorer le profil lipidique chez le patient (298). On peut donc se demander dans quelle mesure les PE interagissant avec ces récepteurs peuvent compromettre l'efficacité des glitazones. Les polluants qui agissent sur les récepteurs PPAR pourraient également perturber l'efficacité d'une autre catégorie de médicament : les fibrates. Ces molécules, utilisées dans le traitement de l'hyperlipidémie, interagissent avec le récepteur PPAR α .

Dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients, il est également nécessaire de s'interroger sur la façon dont les PE peuvent compliquer le tableau clinique de la pathologie. Une étude a mis en évidence le lien entre l'exposition à plusieurs phtalates et une augmentation du stress oxydatif, des niveaux d'adiponectine ainsi que ceux des cytokines inflammatoires chez des patients diabétiques. Ces paramètres peuvent avoir un effet délétère sur les patients, tant sur la physiopathologie du diabète que sur les complications de la pathologie (299). Une autre étude a révélé que l'exposition aux phtalates, chez une petite cohorte de 42 patients diabétiques, était associée à une augmentation des taux d'hémoglobine glyquée. Cette détérioration est un indicateur d'un contrôle glycémique insuffisant chez ces patients, cela pourrait donc traduire une diminution de l'efficacité des traitements ou une accentuation des phénomènes physiopathologiques de la maladie (300). L'exposition à certains polluants organochlorés a également été associée aux complications neuropathiques chez 242 patients diabétiques de la cohorte américaine NHANES (301). Enfin, certains auteurs ont rapporté qu'une diminution de l'exposition aux perturbateurs endocriniens pourrait améliorer le contrôle glycémique et l'insulino-résistance (276). Diminuer l'exposition aux PE pourrait donc avoir un impact sur l'incidence du DT2 mais également se montrer bénéfique pour les malades en favorisant l'efficacité des traitements et/ou en diminuant la survenue de complications (276).

Nos investigations en collaboration avec le Service de Diabétologie du CHU de Liège pourraient être le point de départ d'études plus ambitieuses. Bien que nous ayons bénéficié d'un nombre non négligeable d'échantillons et que nous nous appuyons sur des modèles statistiques robustes, le caractère transversal de l'étude exclut toute interprétation de causalité entre les données obtenues et le diabète de type 2. Ainsi, le suivi de cette cohorte sur le long terme pourrait nous fournir des informations pertinentes sur l'impact des polluants environnementaux sur la physiopathologie du DT2. Cependant, une limitation importante de l'étude est que notre population est constituée uniquement d'individus adultes alors que comme nous l'avons abordé en introduction, le DT2 est une pathologie qui pourrait résulter, du moins en partie, d'une programmation métabolique initiée bien plus tôt dans la vie, voire dès la période fœtale. Cette hypothèse s'appuie sur le concept de la DOHaD, selon lequel des expositions précoces, en particulier durant la grossesse, la petite enfance ou la puberté, peuvent perturber durablement le métabolisme, l'homéostasie glucidique, et le

développement des tissus sensibles à l'insuline (foie, tissu adipeux, pancréas) (154,302). Plusieurs études expérimentales ont ainsi démontré que l'exposition *in utero* à certains PE tels que les bisphénols, les phtalates ou les dioxines peut induire une altération de la programmation des cellules β -pancréatiques, une résistance à l'insuline, ou encore une dérégulation du métabolisme glucidique, favorisant le diabète à l'âge adulte (141,303). Le fait que notre population soit composée uniquement d'adultes nous empêche de détecter les étapes initiales d'un processus pathologique, ce qui limite notre capacité à identifier les relations de cause à effet et ne met en évidence que l'effet final. Pour pallier cette limite, il serait pertinent de mettre en place des études longitudinales prospectives, démarrant dès la vie *in utero* voir pré conceptionnelle, avec un suivi répété des expositions environnementales, de la croissance, de paramètres métaboliques et de marqueurs précoce de diabète ou d'insulino-résistance. Ce type d'études, comme celles sur la cohorte de naissance européennes HELIX offrent une méthodologie intéressante pour explorer ces enjeux (304,305).

La toxicologie environnementale est un domaine en constante évolution, où de nouveaux outils, issus des sciences -omiques, de l'intelligence artificielle (IA), offrent des perspectives complémentaires pour affiner l'évaluation des effets des polluants.

Les approches -omiques (métabolomique, protéomique, transcriptomique, etc.) permettent aujourd'hui d'explorer de manière systémique les perturbations biologiques induites par des expositions chimiques, en identifiant des signatures moléculaires précoce liées à des modifications physiopathologiques (306–308). Ces outils sont particulièrement adaptés à l'étude des PE qui exercent souvent des effets subtils, multifactoriels, et à faible dose. Par exemple, des travaux ont montré que l'exposition au bisphénol A pouvait altérer de manière mesurable le profil métabolomique, suggérant un effet biologique même en l'absence de pathologie manifeste (309).

L'essor de l'IA et des technologies dérivées constituera une avancée majeure pour analyser les vastes jeux de données générés par les technologies -omiques (310). L'IA permet d'identifier des modèles d'association complexes, de réaliser des classifications, ou encore de prédire la toxicité de molécules à partir de leurs propriétés chimiques et biologiques (311). En combinaison avec les données -omiques, elle facilite la détection de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou de susceptibilité, et permet de mieux comprendre les effets des polluants ou des mélanges de polluants (140,312).

Ces outils peuvent également enrichir la modélisation mécanistique des effets des polluants au travers du cadre des Adverse Outcome Pathways (AOP). Les AOP visent à décrire les enchaînements causaux entre un événement moléculaire initial (par exemple, l'interaction avec un récepteur nucléaire) et une issue clinique défavorable, telle que l'apparition d'un DT2. Dans ce contexte, l'IA peut être mobilisée pour structurer et automatiser la construction d'AOP à partir de données *in silico*, expérimentales, -omiques ou épidémiologiques (311,313).

Notre étude épidémiologique apporte une contribution essentielle dans ce domaine en continue évolution. En identifiant, par des modèles statistiques robustes et complémentaires comme utilisé dans nos travaux, des associations entre l'exposition à divers polluants et le statut diabétique de volontaires, elle fournit des données populationnelles concrètes qui pourraient permettre de confirmer ou d'orienter les hypothèses mécanistiques générées par d'autres approches. Les données épidémiologiques peuvent ainsi servir de base de validation pour les signatures identifiées par les approches -omiques, ou contribuer à nourrir des modèles d'IA cherchant à prédire le risque pathologique à partir de profils d'exposition (314,315).

À l'avenir, une intégration plus poussée de données multi-niveaux, allant des modèles *in silico* et *in vitro* jusqu'aux données épidémiologiques, pourrait conduire à une toxicologie environnementale plus intégrée, mécanistique et prédictive. Dans cette approche, les études épidémiologiques comme la nôtre conservent une place centrale, en ancrant les avancées technologiques dans des observations cliniques réelles au sein de la population.

Chapitre 7. CONCLUSION

L'objectif de cette thèse était de contribuer à l'étude de l'incidence des produits à effets perturbateurs endocriniens sur le diabète de type 2. Pour atteindre cet objectif, nous avions identifié plusieurs questions auxquelles nous pouvons maintenant apporter des éléments de réponse.

Alors que le nombre de substances chimiques présentes dans l'environnement augmente depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale, l'incidence du diabète de type 2 est également en forte augmentation et l'âge d'apparition de cette pathologie diminue. Parallèlement, de plus en plus de données *in vitro* et *in vivo* chez l'animal indiquent un effet des polluants de l'environnement dans la physiopathologie du diabète de type 2. Notre synthèse d'une partie des données de la littérature concernant la thématique nous a permis de constater que certaines substances incriminées pour leur lien avec le DT2 étaient des composés rapidement métabolisés dits non persistants.

La première question qui se posait concernait le type de prélèvement à utiliser pour établir la contamination par les différents polluants.

Nous avons débuté nos travaux par la mise au point d'une méthode analytique permettant le dosage simultané de plusieurs polluants environnementaux dans le cheveu : huit PFAS, deux bisphénols et trois parabènes. Les performances de cette méthode ont été validées selon les critères de la Société Française des Sciences et Techniques (172,198–200). Les limites de quantification sont comprises entre 0,2 et 10 pg/mg et correspondent aux concentrations attendues dans une population générale d'après les données de la littérature. Cette méthode d'analyse ne nécessite qu'un nombre réduit d'étapes d'extraction et est donc applicable à un grand nombre d'échantillons. Aucune valeur de référence n'étant disponible pour les concentrations de ces polluants dans les cheveux d'une population vivant en Province de Liège, nous avons utilisé notre méthode pour réaliser un biomonitoring en utilisant les échantillons capillaires de 114 volontaires sans exposition professionnelle et vivant en région liégeoise.

Cette étude a fourni les résultats suivants :

- Le BPA et le BPS ont été détectés dans 93,9 % et 97,4 % des échantillons ;
- Parmi les parabènes, le composé prédominant était le MP quantifié dans 94,7 % des échantillons devant l'EP (66,7 %) et le PrP (54,8 %) ;

- Concernant les PFAS, seul le PFOA a été quantifié dans un nombre significatif d'échantillons (46,4 % des échantillons), les autres PFAS n'ont été détectés que dans un faible nombre d'échantillons.

Nous avons comparé ces résultats avec les concentrations capillaires mesurées dans d'autres cohortes et il apparaît que la contamination de notre population est similaire à ce qui est observé dans d'autres populations issues de pays européens.

Nous avons ensuite voulu mettre en évidence dans quelle mesure les concentrations retrouvées dans le cheveu sont en lien avec la contamination interne que l'on évalue, en général, en utilisant le sang pour les composés persistants et l'urine pour les polluants non persistants.

Pour répondre à cette question, nous avons mesuré les concentrations de huit PFAS et de six PCB dans les cheveux et dans le sérum de 30 volontaires. Chaque volontaire a également fourni un échantillon urinaire, nous permettant d'y mesurer les niveaux de contamination de deux bisphénols et trois parabènes afin de les comparer avec les concentrations retrouvées dans les cheveux. À travers cette étude, nous avons observé que :

- Le profil de contamination des PFAS, des PCB et des bisphénols différait fortement entre les matrices ;
- L'étude statistique de la corrélation des concentrations entre les matrices nous a montré que les informations fournies par les différentes matrices n'étaient similaires que pour le PCB 180 et certains parabènes (EP et PrP).

L'investigation de la distribution des polluants entre les matrices de référence (l'urine et le sérum) et les cheveux nous montre que les informations fournies sont sensiblement différentes même pour les substances appartenant à une même famille. Pour le biomonitoring des PFAS et des PCB, la matrice la plus appropriée semble être le sérum. Par rapport au cheveu, les PFAS sont bien plus détectés dans le sérum et cette matrice représente la contamination interne. Pour les polluants non persistants, les distributions différaient largement entre les matrices pour les bisphénols tandis que les informations fournies par les cheveux et l'urine pour les parabènes semblaient correspondre. Cependant, les limitations de la matrice cheveux ne nous permettent pas de garantir la fiabilité des résultats. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler sur des échantillons urinaires pour notre étude sur le diabète de type 2.

Pour répondre à la question de l'association entre PE et DT2, nous avons réalisé une étude épidémiologique incluant 105 patients diabétiques, recrutés avec l'aide du Service de Diabétologie du CHU de Liège entre 2020 et 2021. Parallèlement, nous avons recruté 98 volontaires sains parmi les donneurs de sang de la Croix Rouge de Belgique et le personnel de l'Université ou du CHU de Liège. Dans les échantillons sériques, nous avons mesuré les concentrations de plusieurs PFAS, PCB et du 4,4'-DDE. Les échantillons urinaires nous ont permis de doser des bisphénols, des parabènes, des métabolites des phthalates, la BP-3, le TCS et les métabolites des OP. Nous avons analysé les méthodes d'ajustement des concentrations sanguines et urinaires des polluants par rapport aux lipides sériques et à la dilution urinaire. Une fois les méthodes d'ajustement les plus adaptées déterminées, nous avons évalué l'association entre les concentrations des polluants mesurés dans notre étude et le statut diabétique. Nous avons mis en évidence que plusieurs polluants : les PCB 118, 138, 153, 156, 167, 180, le PFHxS et le 4,4'-DDE étaient significativement et individuellement associés au statut diabétique.

Nous avons ensuite tenté d'évaluer l'effet des associations entre les PE. Pour les 19 composés mesurés dans plus de 75 % des échantillons de notre population, en plus des modèles monopolluants, nous avons appliqué deux approches permettant de mettre en évidence l'impact de la coexposition sur le statut diabétique, à savoir la régression WQS et la méthode BKMR. Ces méthodes permettent toutes deux d'évaluer l'effet global du mélange de polluants et d'identifier dans ce mélange les substances qui ont une plus grande importance dans le modèle statistique. Par rapport à la régression WQS, la méthode BKMR permet en outre de mettre en évidence d'éventuelles relations non monotones et interactions entre les polluants. Nous avons pu mettre en évidence que la contamination par les mélanges de polluants était positivement associée au statut diabétique. Les polluants persistants ayant le plus d'impact dans les modèles sont le PFHxS et le PFOS total, le 4,4'-DDE et certains PCB (les congénères 118, 138, 180), ceci rejoint les constats que nous avions faits avec les analyses monopolluants. Par contre, plusieurs polluants urinaires ont également été mis en évidence pour leur importance dans les modèles multipolluants : le DEP, le 5-OH-MEHP et le MEP, ce qui n'était pas le cas lorsqu'ils ont été étudiés individuellement. Les associations observées lors de l'investigation de la coexposition indiqueraient que l'association de plusieurs substances peut mener à des effets toxiques. Cela démontre d'un point de vue épidémiologique l'impact des

effets cocktails sur le DT2 et la nécessité de ne pas se restreindre à l'approche monopolluant dans les études épidémiologiques.

Au total, notre étude indique avec un niveau de confiance élevé que le PFHxS, le 4,4'-DDE, les PCB 118, 138, 153, 156, 180, le DEP, le MEP et le 5-OH-MEHP sont positivement associés au DT2. A travers notre travail, nous mettons en évidence non seulement l'importance de prendre en compte l'impact de la coexposition aux mélanges de polluants mais également de réaliser des modèles incluant des polluants de familles chimiques différentes.

Plus de cinq décennies se sont écoulées depuis que les premiers scientifiques ont mis en évidence l'impact des polluants environnementaux sur le système endocrinien. Depuis, les connaissances scientifiques ont grandement évolué et les effets des perturbateurs endocriniens sont bien documentés. Cependant, des manquements persistent. Par exemple, à ce jour, il n'existe toujours pas de classification officielle des perturbateurs endocriniens. Certains auteurs ont recommandé la mise en place d'une classification du risque d'effets perturbateurs endocriniens semblable à celle établie pour les substances cancérogènes. Les substances seraient réparties en quatre catégories selon le niveau de preuve de leur toxicité : la classe 1 regrouperait celles dont la toxicité a été observée *in vivo* chez l'Homme, la classe 2 comprendrait les substances toxiques *in vivo* chez l'animal et *in vitro* sur des cellules humaines, la classe 3 inclurait les molécules dont la toxicité est démontrée *in vivo* chez l'animal, et la classe 4 concernerait les composés présentant une toxicité *in vitro* sur des cellules humaines (316). L'établissement d'une classification officielle pour les perturbateurs endocriniens constituerait une avancée dans la reconnaissance de leur toxicité.

Bien que les récentes actualités médiatiques, notamment celles concernant la pollution environnementale par les PFAS, aient sensibilisé la population wallonne à la problématique des perturbateurs endocriniens, une grande partie de la population belge reste encore indifférente à cette question. Au début de la décennie, en Belgique, une étude des Mutualités Libres révélait que 48 % de la population belge n'avait jamais entendu parler des perturbateurs endocriniens et que 60 % en ignorait l'impact sur la santé (317). Les scientifiques ont ici un rôle crucial à jouer : vulgariser les résultats de leurs recherches et sensibiliser les populations les plus vulnérables, comme les femmes enceintes. Dans cette optique, nous pouvons saluer l'initiative de certains hôpitaux liégeois qui organisent des ateliers de prévention sur les risques des perturbateurs endocriniens destinés directement aux patientes enceintes (318).

En 2025, alors qu'un président ouvertement climatosceptique et insensible à la question de la santé environnementale démolit les uns après les autres les institutions de recherche et les financements scientifiques et censure la science, il est légitime de se demander quel impact auront nos travaux de recherche dans le monde de demain. Pourtant, le travail des scientifiques qui ont décidé de mettre leur temps, leur énergie, leurs connaissances au service de la santé environnementale est crucial car, parmi les neufs limites planétaires établies en 2009, six auraient été dépassées en 2023 (319). Ces limites planétaires représentent les seuils que l'humanité ne devrait pas dépasser pour ne pas compromettre les conditions de vie sur Terre. Celles-ci couvrent des thématiques variées : le changement climatique, l'érosion de la diversité, la perturbation des cycles géochimiques de l'azote et du phosphore, le changement d'usage des sols, le cycle de l'eau douce, l'acidification des océans, l'appauvrissement de l'ozone stratosphérique, l'augmentation des aérosols dans l'atmosphère et l'introduction de nouvelles entités dans la biosphère (320). La définition de cette dernière limite (nouvelles entités dans la biosphère) correspond à la quantité de composés anthropogènes introduits sur la Planète Terre incluant : les substances chimiques synthétiques dont les micropolluants, les PE et les polluants organiques. Le rapport publié dans *Science Advances* en 2023, indique que cette limite a déjà été dépassée (319). Chaque contribution scientifique, chaque nouvelle donnée générée mais également chaque action individuelle est essentielle pour tenter de réduire l'impact des polluants chimiques sur les organismes vivants et de préserver la vie dans les années à venir. Avec ce travail, j'ai le sentiment d'avoir modestement contribué à cet effort.

Bibliographie

1. Carson, R. *Printemps silencieux*. (Wildproject, 1962).
2. Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R. & Trasande, L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol* **8**, 703–718 (2020).
3. Chemicals. Available at: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/in-depth/chemicals?activeTab=fa515f0c-9ab0-493c-b4cd-58a32dfa0a>. (Accessed: 7th February 2024)
4. Kwiatkowski, C. F., Bolden, A. L., Liroff, R. A., Rochester, J. R. & Vandenberg, J. G. Communication Twenty-Five Years of Endocrine Disruption Science: Remembering Theo Colborn. *Environ Health Perspect* **124**, 151–154 (2016).
5. Schug, T. T. *et al.* Minireview: Endocrine disruptors: Past lessons and future directions. *Molecular Endocrinology* **30**, 833–847 (2016).
6. Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K. & Zoeller, R. T. *State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012*. (WHO, 2013). doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020
7. Sangeetha, S., Vimalkumar, K. & Loganathan, B. G. Environmental Contamination and Human Exposure to Select Endocrine-Disrupting Chemicals: A Review. *Sustainable Chemistry* **2**, 343–380 (2021).
8. Alavian-Ghavanini, A. & Rüegg, J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **122**, 38–45 (2018).
9. Lopez-Rodriguez, D., Franssen, D., Heger, S. & Parent, A. S. Endocrine-disrupting chemicals and their effects on puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **35**, 101579 (2021).
10. Predieri, B., Iughetti, L., Bernasconi, S. & Street, M. E. Endocrine Disrupting Chemicals' Effects in Children: What We Know and What We Need to Learn? *Int J Mol Sci* **23**, 11899 (2022).

11. Brehm, E. & Flaws, J. A. Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on Male and female reproduction. *Endocrinology* **160**, 1421–1435 (2019).
12. Yuan, B. *et al.* Metabolomics reveals a role of betaine in prenatal DBP exposure-induced epigenetic transgenerational failure of spermatogenesis in rats. *Toxicological Sciences* **158**, 356–366 (2017).
13. Starling, A. P. *et al.* Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and infant growth and adiposity: the Healthy Start Study. *Environ Int* **131**, 104983 (2019).
14. Braun, J. M. *et al.* Prenatal perfluoroalkyl substance exposure and child adiposity at 8 years of age: The HOME study. *Obesity* **24**, 231–237 (2016).
15. Halldorsson, T. I. *et al.* Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: A prospective cohort study. *Environ Health Perspect* **120**, 668–673 (2012).
16. Silva, E., Rajapakse, N. & Kortenkamp, A. Something from ‘nothing’ - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* **36**, 1751–1756 (2002).
17. Labaronne, E. *et al.* Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry* **45**, 83–93 (2017).
18. Vandenberg, L. N. *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* **33**, 378–455 (2012).
19. Hill, C. E., Myers, J. P. & Vandenberg, L. N. Nonmonotonic dose–Response curves occur in dose ranges that are relevant to regulatory decision-making. *Dose-Response* **16**, 1–4 (2018).
20. Stockholm Convention. The POPs: Preparatory meeting to promote action under Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *Internet* (2002). Available at:

- <https://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>.
(Accessed: 9th February 2024)
21. Eisenreich, S. J., Hornbuckle, K. & Jones, K. C. The Global Legacy of POPs: Special Issue. *Environ Sci Technol* **55**, 9397–9399 (2021).
 22. Alharbi, O. M. L., Basheer, A. A., Khattab, R. A. & Ali, I. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *J Mol Liq* **263**, 442–453 (2018).
 23. Pirard, C., Dufour, P. & Charlier, C. Background contamination of perfluoralkyl substances in a Belgian general population. *Toxicol Lett* **333**, 13–21 (2020).
 24. Mansouri, A. *et al.* The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review. *Appl Biochem Biotechnol* **181**, 309–339 (2017).
 25. Matsushima, A. A Novel Action of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife; DDT and Its Derivatives Have Remained in the Environment. *Int J Mol Sci* **19**, 1–14 (2018).
 26. Stockholm Convention. DDT Overview. (2008). Available at: <https://chm.pops.int/Implementation/PesticidePOPs/DDT/Overview/tabid/378/Default.aspx>. (Accessed: 8th February 2024)
 27. P,P'-dde | C14H8Cl4 | CID 3035 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3035#section=2D-Structure>. (Accessed: 18th June 2025)
 28. Pirard, C., Compere, S., Firquet, K. & Charlier, C. The current environmental levels of endocrine disruptors (mercury, cadmium, organochlorine pesticides and PCBs) in a Belgian adult population and their predictors of exposure. *Int J Hyg Environ Health* **221**, 211–222 (2018).
 29. Vorkamp, K. An overlooked environmental issue? A review of the inadvertent formation of PCB-11 and other PCB congeners and their occurrence in consumer products and in the environment. *Science of the Total Environment* **541**, 1463–1476 (2016).

30. Grossman, E. Nonlegacy PCBs Pigment Manufacturing By - Products Get a Second Look. *Environ Health Perspect* **121**, 1–8 (2013).
31. Grimm, F. A. *et al.* Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. *Crit Rev Toxicol* **45**, 245–272 (2015).
32. 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl | C12H4Cl6 | CID 37034 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37034#section=3D-Conformer>. (Accessed: 18th June 2025)
33. 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl | C12H5Cl5 | CID 35823 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/35823>. (Accessed: 18th June 2025)
34. 2,4,4'-Trichlorobiphenyl | C12H7Cl3 | CID 23448 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23448>. (Accessed: 18th June 2025)
35. Montano, L. *et al.* Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Environment: Occupational and Exposure Events, Effects on Human Health and Fertility. *Toxics* **10**, 1–21 (2022).
36. Idowu, I. G., Megson, D., Tiktak, G., Dereviankin, M. & Sandau, C. D. Polychlorinated biphenyl (PCB) half-lives in humans: A systematic review. *Chemosphere* **345**, (2023).
37. ISSeP. BMH-WAL Surveiller l'exposition des Wallons aux substances chimiques RESUME. *BIOMONITORING HUMAIN WALLON BMH-WAL RESUME* (2021).
38. OECD. Portal on Per and Poly Fluorinated Chemicals. *Internet* (2011). Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/portal-perfluorinated-chemicals/aboutpfass/>. (Accessed: 8th February 2024)
39. Perfluorohexanesulfonic Acid | C6F13SO3H | CID 67734 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/67734>. (Accessed: 18th June 2025)

40. Perfluorooctanoic acid | C8HF15O2 | CID 9554 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9554>. (Accessed: 18th June 2025)
41. Perfluorooctanesulfonic acid | C8F17SO3H | CID 74483 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/74483#section=Chemical-and-Physical-Properties>. (Accessed: 18th June 2025)
42. Rosato, I., Bonato, T., Fletcher, T., Batzella, E. & Canova, C. Estimation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) half-lives in human studies: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res* **242**, 117743 (2024).
43. Grgas, D., Petrina, A., Štefanac, T., Bešlo, D. & Landeka Dragičević, T. A Review: Per- and Polyfluoroalkyl Substances—Biological Degradation. *Toxics* **11**, 446 (2023).
44. Dewapriya, P. *et al.* Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in consumer products: Current knowledge and research gaps. *Journal of Hazardous Materials Letters* **4**, 100086 (2023).
45. Butenhoff, J. L. & Rodricks, J. V. Human Health Risk Assessment of Perfluoroalkyl Acids. in *Molecular and Integrative Toxicology* (ed. DeWitt, J. C.) 363–418 (2015). doi:10.1007/978-3-319-15518-0_15
46. Abunada, Z., Alazaiza, M. Y. D. & Bashir, M. J. K. An Overview of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in the Environment: Source, Fate, Risk and Regulations. *Water (Basel)* **12**, 3590 (2020).
47. Mokra, K. Endocrine disruptor potential of short-and long-chain perfluoroalkyl substances (Pfass)—a synthesis of current knowledge with proposal of molecular mechanism. *Int J Mol Sci* **22**, 1–36 (2021).
48. Panieri, E., Baralic, K., Djukic-Cosic, D., Djordjevic, A. B. & Saso, L. PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment. *Toxics* **10**, 1–55 (2022).
49. Zahm, S. *et al.* Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. *Lancet Oncol* **25**, 16–17 (2024).

50. IARC. Monographs evaluate the carcinogenicity of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS). Available at: <https://www.iarc.who.int/news-events/arc-monographs-evaluate-the-carcinogenicity-of-perfluorooctanoic-acid-pfoa-and-perfluorooctanesulfonic-acid-pfos/>. (Accessed: 8th February 2024)
51. Stockholm Convention. Overview on PFAS. *Internet* (2023). Available at: <https://chm.pops.int/Implementation/IndustrialPOPs/PFAS/Overview/tabid/5221/Default.aspx>. (Accessed: 8th February 2024)
52. Rochester, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology* **42**, 132–155 (2013).
53. Ma, Y. *et al.* The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res* **176**, 108575 (2019).
54. Tarafdar, A. *et al.* The hazardous threat of Bisphenol A: Toxicity, detection and remediation. *J Hazard Mater* **423**, 127097 (2022).
55. Michałowicz, J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* **37**, 738–758 (2014).
56. Moon, M. K. Concern about the safety of bisphenol a substitutes. *Diabetes Metab J* **43**, 46–48 (2019).
57. EU. EU, 2011. Commission implementing regulation (EU) no. 321/2011 of 1 April 2011 amending regulation (EU) no. 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. *Official Journal of the European Union* 3–4 (2011).
58. EU. Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A. *Official Journal of the European Union* **2001**, 20–30 (2016).

59. Rochester, J. R. & Bolden, A. L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* **123**, 643–650 (2015).
60. den Braver-Sewradj, S. P., van Spronsen, R. & Hessel, E. V. S. Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Crit Rev Toxicol* **50**, 128–147 (2020).
61. Lee, S. *et al.* Pharmacokinetics and toxicity evaluation following oral exposure to bisphenol F. *Arch Toxicol* **96**, 1711–1728 (2022).
62. Oh, J., Choi, J. W., Ahn, Y. A. & Kim, S. Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. *Environ Int* **112**, 127–133 (2018).
63. Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G. & Dekant, W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* **15**, 1281–1287 (2002).
64. Bisphenol A | C15H16O2 | CID 6623 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623#section=Chemical-and-Physical-Properties>. (Accessed: 18th June 2025)
65. Bisphenol F | C13H12O2 | CID 12111 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12111#section=Chemical-and-Physical-Properties>. (Accessed: 18th June 2025)
66. Bisphenol S | C12H10O4S | CID 6626 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-S>. (Accessed: 22nd June 2025)
67. Vasiljevic, T. & Harner, T. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of The Total Environment* **789**, 148013 (2021).

68. Pirard, C. & Charlier, C. Urinary levels of parabens, phthalate metabolites, bisphenol A and plasticizer alternatives in a Belgian population: Time trend or impact of an awareness campaign? *Environ Res* **214**, 113852 (2022).
69. Weatherly, L. M. & Gosse, J. A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **20**, 447–469 (2017).
70. Triclosan | C12H7Cl3O2 | CID 5564 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564#section=Chemical-and-Physical-Properties>. (Accessed: 18th June 2025)
71. EU Scientific Committee on Consumer Safety. *Scientific advice on the safety of triclocarban and triclosan as substances with potential endocrine disrupting properties in cosmetic products*. (2022).
72. Wnuk, W., Michalska, K., Krupa, A. & Pawlak, K. Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Postepy Dermatol Alergol* **39**, 26–33 (2022).
73. Oxybenzone | C14H12O3 | CID 4632 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4632#section=Depositor-Supplied-Synonyms>. (Accessed: 18th June 2025)
74. Mustieles, V. *et al.* Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ Int* **173**, 107739 (2023).
75. Ghazipura, M., McGowan, R., Arslan, A. & Hossain, T. Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity: A systematic review of human and animal studies. *Reproductive Toxicology* **73**, 175–183 (2017).
76. Wang, Y. & Qian, H. Phthalates and their impacts on human health. *Healthcare (Switzerland)* **9**, 1–9 (2021).
77. Diethyl Phthalate | C12H14O4 | CID 6781 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6781>. (Accessed: 18th June 2025)

78. Dibutyl Phthalate | C16H22O4 | CID 3026 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3026#section=SMILES>. (Accessed: 18th June 2025)
79. Bis(2-ethylhexyl) phthalate | C24H38O4 | CID 8343 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8343>. (Accessed: 22nd June 2025)
80. Wang, W., Leung, A. O. W., Chu, L. H. & Wong, M. H. Phthalates contamination in China: Status, trends and human exposure-with an emphasis on oral intake. *Environmental Pollution* **238**, 771–782 (2018).
81. Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R. & Angerer, J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* **79**, 367–376 (2005).
82. Sree, C. G., Buddolla, V., Lakshmi, B. A. & Kim, Y. J. Phthalate toxicity mechanisms: An update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* **263**, 109498 (2023).
83. Engel, A. *et al.* Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER α , ER β , and AR. *Toxicol Lett* **277**, 54–63 (2017).
84. Juliano, C. & Magrini, G. Cosmetic Ingredients as Emerging Pollutants of Environmental and Health Concern. A Mini-Review. *Cosmetics* **4**, 11 (2017).
85. Lincho, J., Martins, R. C. & Gomes, J. Paraben compounds part i: An overview of their characteristics, detection, and impacts. *Applied Sciences (Switzerland)* **11**, 1–38 (2021).
86. Methylparaben | C8H8O3 | CID 7456 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7456>. (Accessed: 22nd June 2025)

87. Ethylparaben | C9H10O3 | CID 8434 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8434>. (Accessed: 22nd June 2025)
88. Propylparaben | C10H12O3 | CID 7175 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7175>. (Accessed: 22nd June 2025)
89. Ana, F. & Paula, F. A. Parabens paradoxes in cosmetic formulations: a review. *Int J Med Res Pharm Sci* **8**, 3 (2016).
90. Karpuzoglu, E., Holladay, S. D. & Gogal, R. M. Parabens: Potential impact of Low-Affinity Estrogen receptor Binding chemicals on Human health. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **16**, 321–335 (2013).
91. Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S. & Hass, U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* **30**, 301–312 (2010).
92. Darbre, P. D. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr Obes Rep* **6**, 18–27 (2017).
93. EU. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal of the European Union* **L 282**, 10–13 (2014).
94. Mukherjee, S. & Gupta, R. D. Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments. *J Toxicol* **2020**, 3007984 (2020).
95. Adeyinka, A., Muco, E., Regina, A. C. & Pierre, L. Organophosphates. in *Hazardous Chemicals: Agents of Risk and Change, 1800-2000* 267–293 (StatPearls Publishing, 2023). doi:10.5005/jp/books/11606_36
96. Yang, F. W., Zhao, G. P., Ren, F. Z., Pang, G. F. & Li, Y. X. Assessment of the endocrine-disrupting effects of diethyl phosphate, a nonspecific metabolite of organophosphorus pesticides, by in vivo and in silico approaches. *Environ Int* **135**, 105383 (2020).

97. Okoroiwu, H. U. & Iwara, I. A. Dichlorvos toxicity: A public health perspective. *Interdiscip Toxicol* **11**, 129–137 (2018).
98. EFSA. Conclusion on pesticide peer review regarding the risk assessment of the active substance malathion. *EFSA Journal* **7**, (2009).
99. Chlorpyrifos & Chlorpyrifos-methyl - European Commission. Available at: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/approval-active-substances-safeners-and-synergists/renewal-approval/chlorpyrifos-chlorpyrifos-methyl_en. (Accessed: 20th June 2025)
100. Dichlorvos | C4H7Cl2O4P | CID 3039 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3039>. (Accessed: 22nd June 2025)
101. Malathion | C10H19O6PS2 | CID 4004 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4004>. (Accessed: 22nd June 2025)
102. Chlorpyrifos | C9H11Cl3NO3PS | CID 2730 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730>. (Accessed: 22nd June 2025)
103. Fenthion | C10H15O3PS2 | CID 3346 - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3346>. (Accessed: 22nd June 2025)
104. Tang, J., Rose, R. L. & Chambers, J. E. Metabolism of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. in *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* (ed. Ramesh C. Gupta) 127–123 (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B978-0-12-088523-7.50011-9
105. Spaan, S. *et al.* Reliability of concentrations of organophosphate pesticide metabolites in serial urine specimens from pregnancy in the Generation R Study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **25**, 286–294 (2015).

106. Neves, A. P. *et al.* Urinary dialkylphosphate metabolites in the assessment of exposure to organophosphate pesticides: from 2000 to 2022. *Environ Monit Assess* **196**, 10 (2024).
107. Yang, F. W., Li, Y. X., Ren, F. Z., Luo, J. & Pang, G. F. Assessment of the endocrine-disrupting effects of organophosphorus pesticide triazophos and its metabolites on endocrine hormones biosynthesis, transport and receptor binding in silico. *Food and Chemical Toxicology* **133**, 110759 (2019).
108. Mitra, A. & Maitra, S. K. Reproductive Toxicity of Organophosphate Pesticides. *Annals of Clinical Toxicology* **1**, 1004 (2018).
109. Yang, F. W., Fang, B., Pang, G. F. & Ren, F. Z. Organophosphorus pesticide triazophos: A new endocrine disruptor chemical of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Pestic Biochem Physiol* **159**, 91–97 (2019).
110. Pirard, C., Remy, S., Giusti, A., Champon, L. & Charlier, C. Assessment of children's exposure to currently used pesticides in wallonia, Belgium. *Toxicol Lett* **329**, 1–11 (2020).
111. Internationnal Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 10th edition. Diabetes Research and Clinical Practice* **102**, (2021).
112. Agence InterMutualiste. Le diabète en Belgique. Available at: <https://www.aim-ima.be/Le-diabete-en-Belgique?lang=fr>. (Accessed: 7th October 2024)
113. Banday, M. Z., Sameer, A. S. & Nissar, S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med* **10**, 174–188 (2020).
114. Scheen, A. J. & Paquot, N. Type 2 diabetes: Journey in the heart of a complex disease [Le diabète de type 2: Voyage au cœur d'une maladie complexe]. *Rev Med Liege* **67**, 326–331 (2012).
115. Moini, J. The Health Impact of Diabetes. in *Epidemiology of Diabetes* 115–145 (2019). doi:10.1016/b978-0-12-816864-6.00008-0
116. Féry, F. & Paquot, N. Etiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2. *Rev Med Liege* **60**, 361–368 (2005).

117. Moini, J. Pathophysiology of Diabetes. in *Epidemiology of Diabetes* 25–43 (2019). doi:10.1016/b978-0-12-816864-6.00003-1
118. Cizza, G., Brown, R. J. & Rother, K. I. Rising incidence and challenges of childhood diabetes. A mini review. *J Endocrinol Invest* **35**, 541–546 (2012).
119. Fénichel, P. & Chevalier, N. Environmental endocrine disruptors: New diabetogens? *C R Biol* **340**, 446–452 (2017).
120. Sargis, R. M. & Simmons, R. A. Environmental neglect: endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. *Diabetologia* **62**, 1811–1822 (2019).
121. Yau, E. T. & Mennear, J. H. The inhibitory effect of DDT on insulin secretion in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **39**, 81–88 (1977).
122. Nadal, A. *et al.* Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11603–11608 (2000).
123. Chevalier, N. & Fénichel, P. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes Metab* **41**, 107–115 (2015).
124. Alonso-Magdalena, P. *et al.* Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER α . *PLoS One* **3**, e2069 (2008).
125. Hurst, C. H. & Waxman, D. J. Activation of PPAR α and PPAR γ by environmental phthalate monoesters. *Toxicological Sciences* **74**, 297–308 (2003).
126. Casals-Casas, C. & Desvergne, B. Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* **73**, 135–162 (2011).
127. Evans, N. *et al.* In vitro activity of a panel of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS), fatty acids, and pharmaceuticals in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha, PPAR gamma, and estrogen receptor assays. *Toxicol Appl Pharmacol* **449**, 116136 (2022).
128. Hinault, C., Caroli-Bosc, P., Bost, F. & Chevalier, N. Critical Overview on Endocrine Disruptors in Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* **24**, 4537 (2023).

129. Zhang, S. *et al.* Chronic Exposure to Aroclor 1254 Disrupts Glucose Homeostasis in Male Mice via Inhibition of the Insulin Receptor Signal Pathway. *Environ Sci Technol* **49**, 10084–10092 (2015).
130. Heindel, J. J. & Blumberg, B. Environmental obesogens: Mechanisms and controversies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **59**, 89–106 (2019).
131. He, X. *et al.* Perfluorooctanoic acid promotes pancreatic β cell dysfunction and apoptosis through ER stress and the ATF4/CHOP/TRIB3 pathway. *Environmental Science and Pollution Research* **29**, 84532–84545 (2022).
132. Donat-Vargas, C. *et al.* Perfluoroalkyl substances and risk of type II diabetes: A prospective nested case-control study. *Environ Int* **123**, 390–398 (2019).
133. Marroqui, L. *et al.* Bisphenol-S and Bisphenol-F alter mouse pancreatic β -cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ER β mediated pathway. *Chemosphere* **265**, 129051 (2021).
134. Alharbi, H. F. *et al.* Exposure to Bisphenol A Substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, and Its Association with Developing Obesity and Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health* **19**, 15918 (2022).
135. Wei, J. *et al.* Epigenetic repression of miR-17 contributed to di(2-ethylhexyl) phthalate-triggered insulin resistance by targeting Keap1-Nrf2/miR-200a axis in skeletal muscle. *Theranostics* **10**, 9230–9248 (2020).
136. Lin, Y. *et al.* Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **301**, 527–538 (2011).
137. Czajka, M. *et al.* Organophosphorus pesticides can influence the development of obesity and type 2 diabetes with concomitant metabolic changes. *Environ Res* **178**, 108685 (2019).

138. Nagaraju, R., Joshi, A. K. R. & Rajini, P. S. Organophosphorus insecticide, monocrotophos, possesses the propensity to induce insulin resistance in rats on chronic exposure. *J Diabetes* **7**, 47–59 (2015).
139. Pourourmohammadi, S. *et al.* Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. *Pestic Biochem Physiol* **88**, 346–352 (2007).
140. Luís, C., Baylina, P., Soares, R. & Fernandes, R. Metabolic Dysfunction Biomarkers as Predictors of Early Diabetes. *Biomolecules* **11**, 1589 (2021).
141. Mitra, T. *et al.* Endocrine disrupting chemicals: gestational diabetes and beyond. *Diabetol Metab Syndr* **16**, 95 (2024).
142. Valentino, R. *et al.* Bisphenol-A Impairs Insulin Action and Up-Regulates Inflammatory Pathways in Human Subcutaneous Adipocytes and 3T3-L1 Cells. *PLoS One* **8**, e82099 (2013).
143. Peddinti, G. *et al.* Early metabolic markers identify potential targets for the prevention of type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 1740–1750 (2017).
144. Shree, N., Ding, Z., Flaws, J. & Choudhury, M. Role of microRNA in Endocrine Disruptor-Induced Immunomodulation of Metabolic Health. *Metabolites* **12**, 1034 (2022).
145. Bertazzi, P. A. *et al.* Health effects of dioxin exposure: A 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* **153**, 1031–1044 (2001).
146. National Academies of Sciences Engineering and Medicine. *Veterans and agent orange : update 11. Veterans and Agent Orange* (2018). doi:10.17226/25137
147. Park, S. K. *et al.* Per- and polyfluoroalkyl substances and incident diabetes in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Diabetologia* **65**, 1157–1168 (2022).
148. Duan, Y. *et al.* Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Environmental Pollution* **243**, 1719–1726 (2018).

149. Henríquez-Hernández, L. A. *et al.* Persistent organic pollutants and risk of diabetes and obesity on healthy adults: Results from a cross-sectional study in Spain. *Science of the Total Environment* **607–608**, 1096–1102 (2017).
150. Lee, D. H. *et al.* Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: A nested case-control study. *Environ Health Perspect* **118**, 1235–1242 (2010).
151. Malarvannan, G. *et al.* Dynamics of persistent organic pollutants in obese adolescents during weight loss. *Environ Int* **110**, 80–87 (2018).
152. Gray, N., Picone, G., Sloan, F. & Yashkin, A. The Relationship between BMI and Onset of Diabetes Mellitus and its Complications. *South Med J.* **108**, 29–36 (2015).
153. Kyrou, I. *et al.* Sociodemographic and lifestyle-related risk factors for identifying vulnerable groups for type 2 diabetes: a narrative review with emphasis on data from Europe. *BMC Endocr Disord* **20**, 134 (2020).
154. Hoffman, D. J., Powell, T. L., Barrett, E. S. & Hardy, D. B. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev* **101**, 739–795 (2021).
155. Farrugia, F., Aquilina, A., Vassallo, J. & Pace, N. P. Bisphenol A and Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Epidemiologic, Functional, and Early Life Factors. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 716 (2021).
156. Rajesh, P. & Balasubramanian, K. Gestational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) impairs pancreatic β -cell function in F1 rat offspring. *Toxicol Lett* **232**, 46–57 (2015).
157. Inadera, H. Developmental origins of obesity and type 2 diabetes: molecular aspects and role of chemicals. *Environ Health Prev Med* **18**, 185–197 (2013).
158. Heindel, J. J. *et al.* Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology* **68**, 3–33 (2017).

159. Barrea, C. *et al.* Impact of antenatal exposure to a mixture of persistent organic pollutants on intellectual development. *Int J Hyg Environ Health* **261**, 114422 (2024).
160. Dufour, P., Pirard, C., Petrossians, P., Beckers, A. & Charlier, C. Association between mixture of persistent organic pollutants and thyroid pathologies in a Belgian population. *Environ Res* **181**, 108922 (2020).
161. LaKind, J. S., Idri, F., Naiman, D. Q. & Verner, M. A. Biomonitoring and Nonpersistent Chemicals—Understanding and Addressing Variability and Exposure Misclassification. *Curr Environ Health Rep* **6**, 16–21 (2019).
162. Dewalque, L., Pirard, C., Vandepaer, S. & Charlier, C. Temporal variability of urinary concentrations of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population. *Environ Res* **142**, 414–423 (2015).
163. Vorkamp, K. *et al.* Biomarkers, matrices and analytical methods targeting human exposure to chemicals selected for a European human biomonitoring initiative. *Environ Int* **146**, 106082 (2021).
164. Roggeman, M. *et al.* Reviewing the variability in urinary concentrations of non-persistent organic chemicals: evaluation across classes, sampling strategies and dilution corrections. *Environ Res* **215**, 114332 (2022).
165. Fäys, F. *et al.* Biomonitoring of fast-elimination endocrine disruptors – Results from a 6-month follow up on human volunteers with repeated urine and hair collection. *Science of The Total Environment* **778**, 146330 (2021).
166. Appenzeller, B. M. R. Hair Analysis for the Biomonitoring of Human Exposure to Organic Pollutants. in *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology* 179–196 (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801700-5.00007-8
167. Appenzeller, B. M. R. & Tsatsakis, A. M. Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: State of the art, critical review and future needs. *Toxicol Lett* **210**, 119–140 (2012).

168. Alves, A. *et al.* Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: State of the art and future potential. *Anal Bioanal Chem* **406**, 4063–4088 (2014).
169. Li, J. *et al.* Can nail, hair and urine be used for biomonitoring of human exposure to perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid? *Environ Int* **53**, 47–52 (2013).
170. Boumba, V., Ziavrou, K. & Vougiouklakis, T. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* **25**, 143–163 (2006).
171. Junaid, M. *et al.* A meta-analysis highlighting the increasing relevance of the hair matrix in exposure assessment to organic pollutants. *Science of the Total Environment* **917**, 170535 (2024).
172. Hubert, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - Part I. *J Pharm Biomed Anal* **36**, 579–586 (2004).
173. Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. Exposure assessment to parabens, bisphenol A and perfluoroalkyl compounds in children, women and men by hair analysis. *Science of the Total Environment* **695**, 133864 (2019).
174. Lallmahomed, A. *et al.* Characterization of organic contaminants in hair for biomonitoring purposes. *Environ Int* **183**, 108419 (2024).
175. Wang, Y. *et al.* Using hair, nail and urine samples for human exposure assessment of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances. *Science of the Total Environment* **636**, 383–391 (2018).
176. Hardy, E. M. *et al.* Hair versus urine for the biomonitoring of pesticide exposure: Results from a pilot cohort study on pregnant women. *Environ Int* **152**, 106481 (2021).
177. Liu, J. *et al.* Correlation and agreement: overview and clarification of competing concepts and measures. *Shanghai Arch Psychiatry* **28**, 115–120 (2016).

178. Koo, T. K. & Li, M. Y. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med* **15**, 155–163 (2016).
179. McHugh, M. L. Lessons in biostatistics interrater reliability : the kappa statistic. *Biochemica Medica* **22**, 276–282 (2012).
180. Schillemans, T. *et al.* Plasma metabolites associated with exposure to perfluoroalkyl substances and risk of type 2 diabetes – A nested case-control study. *Environ Int* **146**, 106180 (2021).
181. Schisterman, E. F., Whitcomb, B. W., Buck Louis, G. M. & Louis, T. A. Lipid adjustment in the analysis of environmental contaminants and human health risks. *Environ Health Perspect* **113**, 853–857 (2005).
182. O'Brien, K. M., Upson, K., Cook, N. R. & Weinberg, C. R. Environmental chemicals in urine and blood: Improving methods for creatinine and lipid adjustment. *Environ Health Perspect* **124**, 220–227 (2016).
183. Lee, I. *et al.* Associations of urinary concentrations of phthalate metabolites, bisphenol A, and parabens with obesity and diabetes mellitus in a Korean adult population: Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2015–2017. *Environ Int* **146**, 106227 (2021).
184. Schettgen, T., Alt, A., Esser, A. & Kraus, T. Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p,p'-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *Int J Hyg Environ Health* **218**, 380–385 (2015).
185. Magliano, D. J. *et al.* Exposure to persistent organic pollutants and the risk of type 2 diabetes: a case-cohort study. *Diabetes Metab* **47**, 101234 (2021).
186. Yu, L. *et al.* A review of practical statistical methods used in epidemiological studies to estimate the health effects of multi-pollutant mixture. *Environmental Pollution* **306**, 119356 (2022).

187. Cirello, V. *et al.* Thyroid cancer and endocrine disruptive chemicals: a case-control study on per-fluoroalkyl substances and other persistent organic pollutants. *Eur Thyroid J* **13**, e230192 (2024).
188. Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H. & Naville, D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 1–7 (2018).
189. Lind, L., Salihovic, S. & Lind, P. M. Mixtures of environmental contaminants and diabetes. *Science of The Total Environment* **859**, 159993 (2023).
190. Chen, T. *et al.* Associations of chronic exposure to a mixture of pesticides and type 2 diabetes mellitus in a Chinese elderly population. *Chemosphere* **351**, 141194 (2024).
191. Kang, H. & Kim, S.-H. Associations between serum perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl concentrations and diabetes mellitus in the Korean general population: Insights from the Korean National Environmental Health Survey 2018–2020. *Int J Hyg Environ Health* **259**, 114385 (2024).
192. Babin, É., Cano-Sancho, G., Vigneau, E. & Antignac, J.-P. A review of statistical strategies to integrate biomarkers of chemical exposure with biomarkers of effect applied in omic-scale environmental epidemiology. *Environmental Pollution* **330**, 121741 (2023).
193. Czarnota, J., Gennings, C. & Wheeler, D. C. Assessment of weighted quantile sum regression for modeling chemical mixtures and cancer risk. *Cancer Inform* **14**, 159–171 (2015).
194. Carrico, C., Gennings, C., Wheeler, D. C. & Factor-Litvak, P. Characterization of Weighted Quantile Sum Regression for Highly Correlated Data in a Risk Analysis Setting. *J Agric Biol Environ Stat* **20**, 100–120 (2015).
195. Bobb, J. F. *et al.* Bayesian kernel machine regression for estimating the health effects of multi-pollutant mixtures. *Biostatistics* **16**, 493–508 (2015).

196. Dufour, P., Pirard, C., Seghaye, M. C. & Charlier, C. Association between organohalogenated pollutants in cord blood and thyroid function in newborns and mothers from Belgian population. *Environmental Pollution* **238**, 389–396 (2018).
197. Dewalque, L., Pirard, C. & Charlier, C. Measurement of Urinary Biomarkers of Parabens, Benzophenone-3, and Phthalates in a Belgian Population. *Biomed Res Int* **2014**, 649314 (2014).
198. Hubert, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - Part II. *J Pharm Biomed Anal* **45**, 70–81 (2007).
199. Hubert, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part III. *J Pharm Biomed Anal* **45**, 82–96 (2007).
200. Hubert, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal. Part IV. Examples of application. *J Pharm Biomed Anal* **48**, 760–771 (2008).
201. Phillips, D. L. *et al.* Chlorinated Hydrocarbon Levels in Human Serum: Effects of Fasting and Feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* **18**, 495–500 (1989).
202. Gys, C. *et al.* Biomonitoring and temporal trends of bisphenols exposure in Japanese school children. *Environ Res* **191**, 110172 (2020).
203. Claessens, J., Pirard, C. & Charlier, C. Determination of contamination levels for multiple endocrine disruptors in hair from a non-occupationally exposed population living in Liege (Belgium). *Science of the Total Environment* **815**, 152734 (2022).
204. Bobb, J. F., Claus Henn, B., Valeri, L. & Coull, B. A. Statistical software for analyzing the health effects of multiple concurrent exposures via Bayesian kernel machine regression. *Environmental Health* **17**, 67 (2018).

205. Cai, A. *et al.* Exposure to a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals and Metabolic Outcomes in Belgian Adolescents. *Environ Sci Technol* **57**, 19871–19880 (2023).
206. European Commission. Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact material. *Official Journal of the European Union* **2001**, 20–30 (2018).
207. ECHA. ANNEX XVII TO REACH – *Conditions of restriction on Bisphenol A*. (2020).
208. Colles, A. *et al.* Perfluorinated substances in the Flemish population (Belgium): Levels and determinants of variability in exposure. *Chemosphere* **242**, 125250 (2020).
209. Schoeters, G. *et al.* Three cycles of human biomonitoring in Flanders – Time trends observed in the Flemish Environment and Health Study. *Int J Hyg Environ Health* **220**, 36–45 (2017).
210. Rice, P. A., Cooper, J., Koh-Fallet, S. E. & Kabadi, S. V. Comparative analysis of the physicochemical, toxicokinetic, and toxicological properties of ether-PFAS. *Toxicol Appl Pharmacol* **422**, 115531 (2021).
211. Forsthuber, M. *et al.* Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environ Int* **137**, 105324 (2020).
212. Pye, E. S., Wallace, S. E., Marangoni, D. G. & Foo, A. C. Y. Albumin Proteins as Delivery Vehicles for PFAS Contaminants into Respiratory Membranes. *ACS Omega* **8**, 44036–44043 (2023).
213. Subedi, B. H. *et al.* The Role of Statins in Diabetes Treatment. *Diabetes Spectrum* **26**, 156–164 (2013).
214. Margolis, R. & Sant, K. E. Associations between exposures to perfluoroalkyl substances and diabetes, hyperglycemia, or insulin resistance: a scoping review. *J Xenobiot* **11**, 115–129 (2021).

215. Duan, Y. *et al.* Serum concentrations of per-/polyfluoroalkyl substances and risk of type 2 diabetes: A case-control study. *Science of the Total Environment* **787**, 147476 (2021).
216. Han, X. *et al.* Exposure to novel and legacy per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) and associations with type 2 diabetes: A case-control study in East China. *Environ Int* **156**, 106637 (2021).
217. Conway, B., Innes, K. E. & Long, D. Perfluoroalkyl substances and beta cell deficient diabetes. *J Diabetes Complications* **30**, 993–998 (2016).
218. Dunder, L., Salihovic, S., Elmståhl, S., Lind, P. M. & Lind, L. Associations between per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and diabetes in two population-based cohort studies from Sweden. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **33**, 748–756 (2023).
219. Sun, Q. *et al.* Plasma Concentrations of Perfluoroalkyl Substances and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Investigation among U.S. Women. *Environ Health Perspect* **126**, 037001 (2018).
220. Gui, S. Y. *et al.* Association between per- and polyfluoroalkyl substances exposure and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **33**, 40–55 (2023).
221. Zong, G. *et al.* Persistent organic pollutants and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation among middle-aged women in Nurses' Health Study II. *Environ Int* **114**, 334–342 (2018).
222. Wolf, K. *et al.* Persistent organic pollutants and the incidence of type 2 diabetes in the CARLA and KORA cohort studies. *Environ Int* **129**, 221–228 (2019).
223. Mansouri, E. H. & Reggabi, M. Association between type 2 diabetes and exposure to chlorinated persistent organic pollutants in Algeria: A case-control study. *Chemosphere* **264**, 128596 (2021).
224. Pavuk, M. *et al.* Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, pesticides, and diabetes in the Anniston

- Community Health Survey follow-up (ACHS II): single exposure and mixture analysis approaches. *Science of The Total Environment* **877**, 162920 (2023).
225. Yipei, Y. *et al.* Assessing the risk of diabetes in participants with DDT DDE exposure- A systematic review and meta-analysis. *Environ Res* **210**, 113018 (2022).
226. Gao, X. *et al.* Polychlorinated biphenyls and risk of metabolic syndrome and comparison with the risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment* **900**, 165773 (2023).
227. Han, X. *et al.* Associations between the exposure to persistent organic pollutants and type 2 diabetes in East China: A case-control study. *Chemosphere* **241**, 125030 (2020).
228. Li, P. *et al.* Association between polychlorinated biphenyls exposure and incident type 2 diabetes mellitus: A nested case-control study. *Environ Res* **228**, 115743 (2023).
229. Tan, Q. *et al.* Associations of polychlorinated biphenyls exposure with plasma glucose and diabetes in general Chinese population: The mediating effect of lipid peroxidation. *Environmental Pollution* **308**, 119660 (2022).
230. Guo, X. *et al.* Association between exposure to organophosphorus pesticides and the risk of diabetes among US Adults: Cross-sectional findings from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Chemosphere* **301**, 134471 (2022).
231. Ma, C. *et al.* Co-exposure of organophosphorus pesticides is associated with increased risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Chemosphere* **332**, 138865 (2023).
232. Zhao, L. *et al.* The Associations between Organophosphate Pesticides (OPs) and Respiratory Disease, Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease: A Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Toxics* **11**, 741 (2023).

233. Lind, P. M., Zethelius, B. & Lind, L. Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly. *Diabetes Care* **35**, 1519–1524 (2012).
234. Sun, Q. *et al.* Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in the nurses' health study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect* **122**, 616–623 (2014).
235. Duan, Y., Sun, H., Han, L. & Chen, L. Association between phthalate exposure and glycosylated hemoglobin, fasting glucose, and type 2 diabetes mellitus: A case-control study in China. *Science of the Total Environment* **670**, 41–49 (2019).
236. Tan, Y. *et al.* Association of phthalate exposure with type 2 diabetes and the mediating effect of oxidative stress: A case-control and computational toxicology study. *Ecotoxicol Environ Saf* **274**, 116216 (2024).
237. Wang, Y. *et al.* Association of Multiple Urinary Phthalates Metabolites with Diabetes Risk in Elderly Population. *Environment and Health* **2**, 140–149 (2024).
238. Zhang, H. *et al.* Phthalate exposure and risk of diabetes mellitus: Implications from a systematic review and meta-analysis. *Environ Res* **204**, 112109 (2022).
239. Duan, Y. *et al.* Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Environmental Pollution* **243**, 1719–1726 (2018).
240. Rancière, F. *et al.* Exposure to Bisphenol A and Bisphenol S and Incident Type 2 Diabetes: A Case–Cohort Study in the French Cohort D.E.S.I.R. *Environ Health Perspect* **127**, 107013 (2019).
241. Delepierre, J., Fosse-Edorh, S., Fillol, C. & Piffaretti, C. Relation of urinary bisphenol concentration and diabetes or prediabetes in French adults: A cross-sectional study. *PLoS One* **18**, e0283444 (2023).
242. Song, Y. *et al.* Exposure to parabens and dysglycemia: Insights from a Chinese population. *Chemosphere* **340**, 139868 (2023).

243. Darbre, P. D. Endocrine Disruption and Disorders of Energy Metabolism. in *Endocrine Disruption and Human Health* 321–339 (Elsevier Inc., 2021). doi:10.1016/B978-0-12-821985-0.00017-7
244. Janesick, A. S. & Blumberg, B. Obesogens: An emerging threat to public health. *Am J Obstet Gynecol* **214**, 559–565 (2016).
245. Hernández-Valdez, J., Velázquez-Zepeda, A. & Sánchez-Meza, J. C. Effect of Pesticides on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Their Association with Obesity and Diabetes. *PPAR Res* **2023**, 1743289 (2023).
246. Zhang, W., Xu, P. & Li, J. The crucial role of thioredoxin interacting protein in the liver insulin resistance induced by di (2-ethylhexyl) phthalates. *Food and Chemical Toxicology* **164**, 113045 (2022).
247. Chung, Y.-L., Hou, Y.-C., Wang, I.-K., Lu, K.-C. & Yen, T.-H. Organophosphate pesticides and new-onset diabetes mellitus: From molecular mechanisms to a possible therapeutic perspective. *World J Diabetes* **12**, 1818–1831 (2021).
248. Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Bishop, A. M. & Needham, L. L. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environ Health Perspect* **118**, 679–685 (2010).
249. Claessens, J., Dufour, P., Dardenne, N., Charlier, C. & Pirard, C. Contamination levels and distribution of persistent and non-persistent pollutants in paired hair, urine and serum samples from a Belgian non-occupationally exposed population. *J Toxicol Environ Health A* **88**, 447–462 (2025).
250. He, X., Liu, Y., Xu, B., Gu, L. & Tang, W. PFOA is associated with diabetes and metabolic alteration in US men: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2012. *Science of the Total Environment* **625**, 566–574 (2018).
251. Charles, D. *et al.* Pre- and post-diagnostic blood profiles of perfluoroalkyl acids in type 2 diabetes mellitus cases and controls. *Environ Int* **145**, 106095 (2020).
252. Lorber, M. *et al.* The effect of ongoing blood loss on human serum concentrations of perfluorinated acids. *Chemosphere* **118**, 170–177 (2015).

253. Gasiorowski, R. *et al.* Effect of Plasma and Blood Donations on Levels of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in Firefighters in Australia. *JAMA Netw Open* **5**, e226257 (2022).
254. Agence fédérale des médicaments et des produits de santé (AFMPS). *Hémovigilance en Belgique, rapport annuel 2020.* (2020).
255. Sépulchre, E., Lutteri, L., Cavalier, E., Guerci, B. & Radermecker, R. P. A PROPOS DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE : les limites de son interprétation. *Rev Med Liege* **69**, 497–503 (2014).
256. Charles, D. *et al.* Longitudinal changes in concentrations of persistent organic pollutants (1986–2016) and their associations with type 2 diabetes mellitus. *Environ Res* **204**, 112129 (2022).
257. Tornevi, A. *et al.* Chlorinated persistent organic pollutants and type 2 diabetes - A population-based study with pre- and post- diagnostic plasma samples. *Environ Res* **174**, 35–45 (2019).
258. Krogstad, V. *et al.* Correlation of Body Weight and Composition With Hepatic Activities of Cytochrome P450 Enzymes. *J Pharm Sci* **110**, 432–437 (2021).
259. Berg, V. *et al.* Pre- and post-diagnostic blood profiles of chlorinated persistent organic pollutants and metabolic markers in type 2 diabetes mellitus cases and controls; a pilot study. *Environ Res* **195**, 110846 (2021).
260. Weekers, L., Scheen, A. J. & Rorive, G. Prévention de la néphropathie diabétique: De la microalbuminurie à l'insuffisance rénale terminale. *Rev Med Liege* **58**, 297–306 (2003).
261. Fonfrède, M. Diabète et rein. *Revue Francophone des Laboratoires* **455**, 45–50 (2013).
262. Shen, Y. *et al.* Bisphenol A analogs in patients with chronic kidney disease and dialysis therapy. *Ecotoxicol Environ Saf* **185**, 109684 (2019).

263. Jain, R. B. & Ducatman, A. Perfluoroalkyl substances follow inverted U-shaped distributions across various stages of glomerular function: Implications for future research. *Environ Res* **169**, 476–482 (2019).
264. Jain, R. B. & Ducatman, A. Perfluoroalkyl acids serum concentrations and their relationship to biomarkers of renal failure: Serum and urine albumin, creatinine, and albumin creatinine ratios across the spectrum of glomerular function among US adults. *Environ Res* **174**, 143–151 (2019).
265. Rigalleau, V. *et al.* Estimation of renal function in patients with diabetes. *Diabetes and Metabolism* **37**, 359–366 (2011).
266. Liu, A. *et al.* Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. *Pharmacol Ther* **195**, 54–84 (2019).
267. Caiati, C., Arrigoni, R., Stanca, A. & Lepera, M. E. Kidney Toxicity of Drugs for the Heart: An Updated Perspective. *Metabolites* **15**, 191 (2025).
268. Yin, J. & Wang, J. Renal drug transporters and their significance in drug–drug interactions. *Acta Pharm Sin B* **6**, 363–373 (2016).
269. Hansen, P. M., Mathiesen, E. R., Kofoed-Enevoldsen, A. & Deckert, T. Possible Effect Enzyme Angiotensin-Converting Inhibition Glomerular Charge Selectivity. *Journal Of Diabetes and its Complication* **9**, 158–162 (1995).
270. Levêque, D. *et al.* Mécanismes des interactions médicamenteuses d'origine pharmacocinétique. *Rev Med Interne* **31**, 170–179 (2010).
271. Li, H., Zheng, C., Zhang, Y., Yang, H. & Li, J. The directed acyclic graph helped identify confounders in the association between coronary heart disease and pesticide exposure among greenhouse vegetable farmers. *Medicine* **102**, e35073 (2023).
272. Weisskopf, M. G., Seals, R. M. & Webster, T. F. Bias Amplification in Epidemiologic Analysis of Exposure to Mixtures. *Environ Health Perspect* **126**, 047003 (2018).
273. Nguyen, Q. C., Osypuk, T. L., Schmidt, N. M., Glymour, M. M. & Tchetgen Tchetgen, E. J. Practical Guidance for Conducting Mediation Analysis With Multiple

- Mediators Using Inverse Odds Ratio Weighting. *Am J Epidemiol* **181**, 349–356 (2015).
274. VanderWeele, T. J. Mediation Analysis: A Practitioner's Guide. *Annu Rev Public Health* **37**, 17–32 (2016).
275. Ao, J. *et al.* The mixture of non-persistent endocrine-disrupting chemicals in relation to endometriosis. *Ecotoxicol Environ Saf* **286**, 117129 (2024).
276. Bai, J. *et al.* Mixed exposure to phenol, parabens, pesticides, and phthalates and insulin resistance in NHANES: A mixture approach. *Science of The Total Environment* **851**, 158218 (2022).
277. Hassen, H. Y. *et al.* Association of environmental pollutants with asthma and allergy, and the mediating role of oxidative stress and immune markers in adolescents. *Environ Res* **265**, 120445 (2025).
278. Chata, C., M. Hardy, E., Grova, N. & Appenzeller, B. M. R. Influence of pesticide physicochemical properties on the association between plasma and hair concentration. *Anal Bioanal Chem* **408**, 3601–3612 (2016).
279. Fischer, F. C. *et al.* Binding of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) to Serum Proteins: Implications for Toxicokinetics in Humans. *Environ Sci Technol* **58**, 1055–1063 (2024).
280. Peng, F.-J. *et al.* Association of hair polychlorinated biphenyls and multiclass pesticides with obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia in NESCAV study. *J Hazard Mater* **461**, 132637 (2024).
281. Katsikantami, I. *et al.* Biomonitoring of bisphenols A and S and phthalate metabolites in hair from pregnant women in Crete. *Science of The Total Environment* **712**, 135651 (2020).
282. Tian, X. *et al.* Distribution of phthalate metabolites, benzophenone-type ultraviolet filters, parabens, triclosan and triclocarban in paired human hair, nail and urine samples. *Environmental Pollution* **333**, 122083 (2023).

283. Erne, R., Bernard, L., Steuer, A. E., Baumgartner, M. R. & Kraemer, T. Hair Analysis: Contamination versus Incorporation from the Circulatory System—Investigations on Single Hair Samples Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* **91**, 4132–4139 (2019).
284. Taylor, K. W. *et al.* Statistical approaches for assessing health effects of environmental chemical mixtures in epidemiology: Lessons from an innovative workshop. *Environ Health Perspect* **124**, 227–229 (2016).
285. Guo, M. *et al.* Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate acid esters and gestational diabetes mellitus: A prospective cohort study. *Int J Hyg Environ Health* **261**, 114419 (2024).
286. An, S. *et al.* In-utero exposure to DDT and pyrethroids and child behavioral and emotional problems at 2 years of age in the VHEMBE cohort, South Africa. *Chemosphere* **306**, 135569 (2022).
287. Amadou, A. *et al.* Multiple xenoestrogen air pollutants and breast cancer risk: Statistical approaches to investigate combined exposures effect. *Environmental Pollution* **351**, 124043 (2024).
288. Benoit, L. *et al.* Impact of mixtures of persistent organic pollutants on breast cancer aggressiveness. *Environ Int* **170**, 107615 (2022).
289. Chen, W.-J. *et al.* Assessing urinary phenol and paraben mixtures in pregnant women with and without gestational diabetes mellitus: A case-control study. *Environ Res* **214**, 113897 (2022).
290. Bellavia, A. *et al.* Association between chemical mixtures and female fertility in women undergoing assisted reproduction in Sweden and Estonia. *Environ Res* **216**, 114447 (2023).
291. Berger, K. *et al.* Prenatal phthalate, paraben, and phenol exposure and childhood allergic and respiratory outcomes: Evaluating exposure to chemical mixtures. *Science of The Total Environment* **725**, 138418 (2020).

292. Zare Jeddi, M. *et al.* Developing human biomonitoring as a 21st century toolbox within the European exposure science strategy 2020–2030. *Environ Int* **168**, 107476 (2022).
293. Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals | Parc. Available at: [https://www.eu-parc.eu/index.php/. \(Accessed: 24th March 2025\)](https://www.eu-parc.eu/index.php/.)
294. Carignan, C. C. *et al.* Self-Collection Blood Test for PFASs: Comparing Volumetric Microsamplers with a Traditional Serum Approach. *Environ Sci Technol* **57**, 7950–7957 (2023).
295. Galletto, M. *et al.* Development and validation of the UHPLC-MS/MS method for the quantitative determination of 25 PFAS in dried blood spots. *Anal Bioanal Chem* **416**, 5671–5687 (2024).
296. Gagnebin, Y. *et al.* Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. *Anal Chim Acta* **955**, 27–35 (2017).
297. Salter, D. M., Wei, W., Nahar, P. P., Marques, E. & Slitt, A. L. Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS) Thwarts the Beneficial Effects of Calorie Restriction and Metformin. *Toxicological Sciences* **182**, 82–95 (2021).
298. Desouza, C. V & Shivaswamy, V. Pioglitazone in the Treatment of Type 2 Diabetes: safety and Efficacy Review. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* **3**, 43–51 (2010).
299. Duan, Y. *et al.* Exposure to phthalates in patients with diabetes and its association with oxidative stress, adiponectin, and inflammatory cytokines. *Environ Int* **109**, 53–63 (2017).
300. Mengozzi, A. *et al.* High exposure to phthalates is associated with HbA1c worsening in type 2 diabetes subjects with and without edentulism: a prospective pilot study. *Diabetol Metab Syndr* **14**, 100 (2022).
301. Lee, D. H., Jacobs, D. R. & Steffes, M. Association of Organochlorine Pesticides with Peripheral Neuropathy in Patients with Diabetes or Impaired Fasting Glucose. *Diabetes* **57**, 3108–3111 (2008).

302. Heindel, J. J. *et al.* Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. *Endocrinology* **156**, 3416–3421 (2015).
303. Lin, J. Y. & Yin, R. X. Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals and Type 2 Diabetes Mellitus in Later Life. *Expo Health* **15**, 199–229 (2023).
304. Maitre, L. *et al.* Human Early Life Exposome (HELIX) study: A European population-based exposome cohort. *BMJ Open* **8**, (2018).
305. Midya, V. *et al.* Association of Prenatal Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals with Liver Injury in Children. *JAMA Netw Open* **5**, E2220176 (2022).
306. Messerlian, C., Martinez, R. M., Hauser, R. & Baccarelli, A. A. ‘Omics’ and endocrine-disrupting chemicals — new paths forward. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 740–748 (2017).
307. Maitre, L. *et al.* Integrating -omics approaches into population-based studies of endocrine disrupting chemicals: A scoping review. *Environ Res* **228**, 115788 (2023).
308. Bedia, C. Metabolomics in environmental toxicology: Applications and challenges. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **34**, (2022).
309. Yang, Z. *et al.* Bisphenol mixtures, metal mixtures and type 2 diabetes mellitus: Insights from metabolite profiling. *Environ Int* **190**, (2024).
310. Ballard, J. L., Wang, Z., Li, W., Shen, L. & Long, Q. Deep learning-based approaches for multi-omics data integration and analysis. *BioData Mining* **17**, (2024).
311. Meng, L. *et al.* Advancing toxicity studies of per- and poly-fluoroalkyl substances (pfass) through machine learning: Models, mechanisms, and future directions. *Science of The Total Environment* **946**, 174201 (2024).
312. Lee, H. S. *et al.* Identification of metabolic markers predictive of prediabetes in a Korean population. *Sci Rep* **10**, (2020).
313. Viganò, E. L., Ballabio, D. & Roncaglioni, A. Artificial Intelligence and Machine Learning Methods to Evaluate Cardiotoxicity following the Adverse Outcome Pathway Frameworks. *Toxics* **12**, 87 (2024).

314. Vermeulen, R., Schymanski, E. L., Barabási, A. L. & Miller, G. W. The exposome and health: Where chemistry meets biology. *Science (1979)* **367**, 392–396 (2020).
315. Chatterjee, N., Shi, J. & García-Closas, M. Developing and evaluating polygenic risk prediction models for stratified disease prevention. *Nature Reviews Genetics* **17**, 392–406 (2016).
316. Karthikeyan, B. S., Ravichandran, J., Mohanraj, K., Vivek-Ananth, R. P. & Samal, A. A curated knowledgebase on endocrine disrupting chemicals and their biological systems-level perturbations. *Science of the Total Environment* **692**, 281–296 (2019).
317. Mutualités Libre. *Perturbateurs Endocriniens: agir pour protéger notre santé*. (2020).
318. RTBF. A Liège, le MontLégia organise des ateliers pour sensibiliser les futurs parents aux dangers des perturbateurs endocriniens. (2025). Available at: <https://www.rtbf.be/article/a-liege-le-montlegia-organise-des-ateliers-pour-sensibiliser-les-futurs-parents-aux-dangers-des-perturbateurs-endocriniens-11515386>. (Accessed: 1st April 2025)
319. Richardson, K. *et al.* Earth beyond six of nine planetary boundaries. *Sci Adv* **9**, eadh2458 (2023).
320. La France face aux neuf limites planétaires | Données et études statistiques. Available at: <https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/la-france-face-aux-neuf-limites-planetaires>. (Accessed: 26th March 2025)

Annexes

Annexe 1 : Analyses monovariées.

Annexe 1.1 : Comparaison des fréquences de détection pour les polluants urinaires dichotomisés

Polluant		Diabétiques	Volontaires sains	P-value
		n (%)	n (%)	
BP3	DéTECTé	64 (64,0)	61 (63,5)	0,946
	Non détECTé	36 (36,0)	35 (36,5)	
BPA	DéTECTé	42 (42,0)	35 (36,1)	0,395
	Non détECTé	58 (58,0)	62 (63,9)	
BPF	DéTECTé	67 (68,4)	56 (60,0)	0,24
	Non détECTé	31 (31,6)	37 (39,9)	
EP	DéTECTé	41 (43,2)	53 (58,2)	0,04
	Non détECTé	54 (56,8)	38 (41,8)	
MEHP	DéTECTé	47 (47,0)	45 (46,9)	0,986
	Non détECTé	53 (53,0)	51 (53,1)	
PrP	DéTECTé	19 (19,0)	24 (25,0)	0,31
	Non détECTé	81 (81,0)	72 (75,0)	
cx-MiNP	DéTECTé	72 (75,0)	61 (64,2)	0,104
	Non détECTé	24 (25,0)	34 (35,8)	

Annexe 1.2 : Comparaison des fréquences de détection pour les polluants sériques dichotomisés

Polluant		Diabétiques	Volontaires sains	P-value
		n (%)	n (%)	
PCB105	DéTECTé	44 (41,9)	34 (35,4)	0,346
	Non détECTé	61 (58,1)	62 (64,6)	
PCB 114	DéTECTé	66 (62,9)	60 (62,5)	0,958
	Non détECTé	39 (37,1)	36 (37,5)	
PCB 157	DéTECTé	24 (22,9)	17 (17,7)	0,365
	Non détECTé	81 (77,1)	79 (82,3)	
PCB 167	DéTECTé	61 (58,1)	37 (38,5)	0,005
	Non détECTé	44 (41,9)	59 (61,5)	
PFDA	DéTECTé	62 (59,0)	72 (75,8)	0,011
	Non détECTé	43 (41,0)	23 (24,2)	

Annexe 1.3 : Comparaison des concentrations urinaires des polluants mesurés dans plus de 70 % des échantillons, les concentrations sont exprimées en concentrations ajustées par le CAS.

Composés	LOQ	Total		Diabète		Contrôles		P-Value
		%>LOQ	Médiane	%>LOQ	Médiane	%>LOQ	Médiane	
Bisphénols & triclosan (µg/L)								
BPS	0,09	70,5	0,470	72,3	0,603	68,0	0,354	0,124
Dialkyls phosphates (µg/L)								
DEP	0,50	91,9	2,64	93,1	2,72	89,8	2,60	0,420
DMTP	0,50	74,7	2,44	72,3	1,18	76,5	1,10	0,739
Parabens (µg/L)								
MP	0,79	89,2	3,59	84,2	3,24	86,73	4,27	0,0919
Phtalates (µg/L)								
MEP	0,94	100	24,22	100	26,8	100	22,6	0,212
MnBP	0,99	99,0	15,43	99,0	15,7	96,9	15,2	0,881
MiBP	1,23	93,9	20,70	95,0	9,40	90,8	10,6	0,708
5-oxo-MEHP	0,13	99,5	2,09	100	2,12	96,9	2,07	0,877
5-OH-MEHP	0,16	100	3,53	100	3,58	96,9	3,33	0,682
MBzP	0,61	82,7	2,23	81,0	2,07	85,6	2,35	0,853

Annexe 1.4 : Comparaison des concentrations entre les patients diabétiques et les volontaires sains. Les concentrations des PFAS sont présentées sous forme volumétriques et les concentrations des PCB sont présentées en pg/g de lipides.

Composés	LOQ	Total		Diabète		Contrôles		P-value
		%>LOQ	Médiane	%>LOQ	Médiane	%>LOQ	Médiane	
PFAS (ng/mL)								
PFHxS	0,10	96,5	0,67	98,1	0,705	91,8	0,642	0,083
PFOA	0,50	90,5	1,03	88,6	1,03	89,8	1,01	0,479
PFNA	0,10	95,5	0,36	95,2	0,35	92,9	0,38	0,191
PFOS total	0,50	99,5	5,67	99,1	5,70	96,9	5,60	0,858
PFOS linéaire	0,50	97,5	2,54	96,2	2,15	95,9	2,86	0,026
PFDA	0,10	67,0	0,13	59,1	0,12	73,5	0,16	0,010
PCB et 4,4'-DDE (pg/g lip.)								
PCB 118	-	82,6	6,09	81,9	6,86	83,3	5,15	0,063
PCB 153	-	99,5	63,0	99,1	75,8	100,0	48,6	<0,001
PCB 138	-	99,5	35,5	99,1	41,3	100,0	27,9	<0,001
PCB 156	-	95,0	6,92	96,2	8,38	93,8	5,55	<0,001
PCB 180	-	99,5	61,4	99,1	71,8	100	53,1	<0,001
4,4'-DDE	-	99,5	143	99,1	119	100	64,3	<0,001

Annexe 2 : résultats complets des modèles WQS

Annexe 2.1 : WQS sur le mélange incluant les polluants urinaires

2.1.1 *Modèle paramétré en non négatif :*

Résumé du modèle :

	OR	SE.OR	95 % CI	P-value
Intercept	0,000325	12,8	0,000 – 0,048	0,002
Age	1,04	1,03	0,985 – 1,09	0,163
Sexe	4,87	1,66	1,79 – 13,2	0,002
IMC	1,28	1,06	1,15 – 1,43	<0,001
Antécédents de diabète familial	4,88	1,58	1,99 – 11,9	<0,001
Education	0,414	1,22	0,280 – 0,612	<0,001
Statut Tabagique	5,01	1,90	1,43 – 17,6	0,012
Consommation d'alcool	0,25	1,68	0,091 – 0,69	0,007
Activité Physique	0,567	1,58	0,231 – 1,39	0,217
Indice WQS	1,97	1,4	1,01 – 3,83	0,045
AIC: 152,91		152,37		

Poids des polluants dans le modèle

Polluant	Poids moyen	Ecart type des poids
DEP	0,394	0,222
MEP	0,249	0,218
5-OH-MEHP	0,123	0,138
MnBP	0,0829	0,118
MBzP	0,0676	0,0997
MP	0,0528	0,0949
5-oxo-MEHP	0,0153	0,0473
MiBP	0,0151	0,0515

2.1.2 Modèle paramétré en non positif

Résumé du modèle :

	OR	SE OR	95 % CI	P-value
Intercept	0,000938	12,3	0,000 - 0,128	0,005
Age	1,04	1,03	0,987 - 1,09	0,151
Sexe	3,92	1,64	1,48 - 10,3	0,006
IMC	1,28	1,06	1,15 - 1,43	<0,001
Antécédents de diabète familial	4,82	1,57	1,99 - 11,7	<0,001
Education	0,431	1,21	0,297 - 0,626	<0,001
Statut Tabagique	4,35	1,89	1,25 - 15,1	0,021
Consommation d'alcool	0,257	1,66	0,096 - 0,692	0,007
Activité Physique	0,533	1,57	0,220 - 1,29	0,163
Indice WQS	1,03	1,39	0,540 - 1,97	0,927
AIC: 157,04				

Poids les polluants dans le modèle :

Polluant	Poids moyen	Ecart type des poids
MiBP	0,350	0,280
MP	0,169	0,172
5-oxo-MEHP	0,135	0,160
MnBP	0,0933	0,117
MBzP	0,0901	0,123
MEP	0,0656	0,0911
5-OH-MEHP	0,0531	0,0657
DEP	0,0438	0,0516

Annexe 2.2 WQS sur le mélange incluant les polluants sériques

Résumé du modèle :

	Odds Ratio	SE,OR	OR 95 % CI	P-value
Intercept	0,00108	11	0,000 – 0,120	0,004
Age	0,996	1,03	0,941 – 1,05	0,9
Sexe	2,22	1,61	0,878 – 5,63	0,092
IMC	1,31	1,06	1,17 – 1,46	<0,001
Antécédents de diabète familial	4,06	1,56	1,69 – 9,74	0,002
Education	0,434	1,21	0,298 – 0,633	<0,001
Statut Tabagique	4,44	1,86	1,32 – 14,93	0,016
Consommation d'alcool	0,346	1,63	0,132 – 0,905	0,031
Activité Physique	0,319	1,6	0,127 – 0,801	0,015
Indice WQS	4,22	1,49	1,92 – 9,23	<0,001
AIC : 155,89				

Poids des polluants dans le modèle :

Polluant	Poids moyen	Ecart-type des poids
PFHxS	0,228	0,146
PCB 180	0,206	0,171
4,4'-DDE	0,167	0,135
PCB 118	0,143	0,141
PFOS total	0,0697	0,105
PCB 138	0,0528	0,121
PCB 156	0,0495	0,107
PFOA	0,0440	0,0771
PCB 153	0,0335	0,0880
PFOS linéaire	0,00537	0,0277
PFNA	0,00276	0,0229

Annexe 2.3 : WQS sur le mélange incluant l'ensemble des polluants

Résumé du modèle

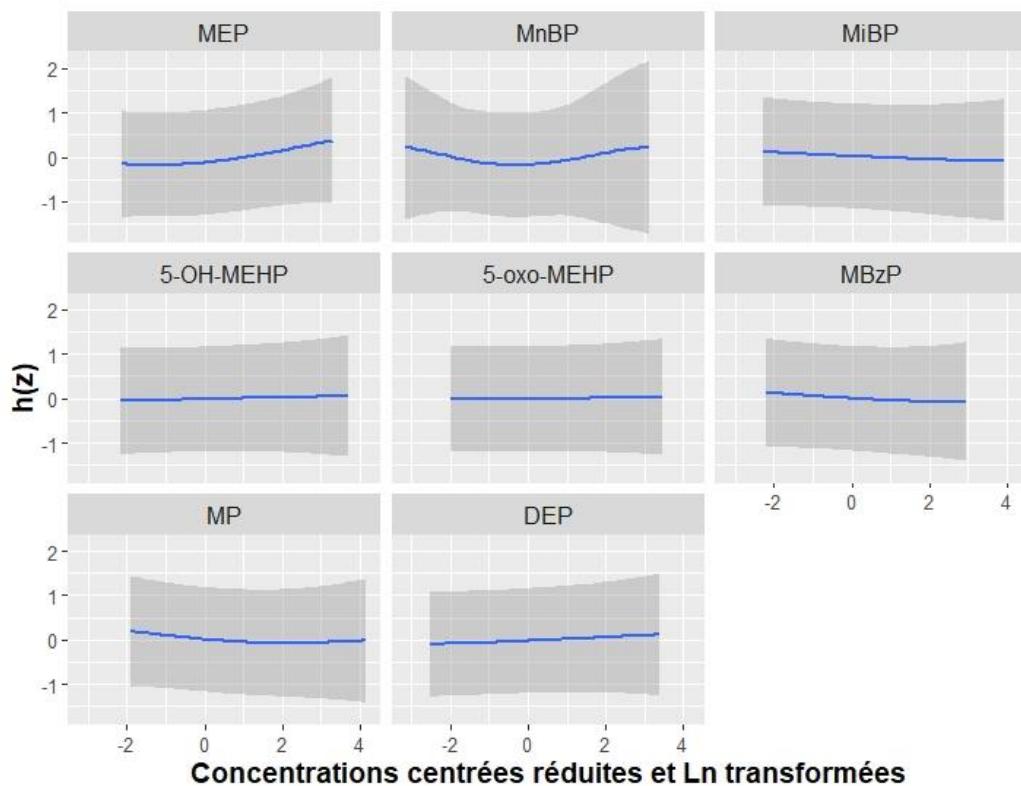
	Odds Ratio	SE.OR	95 % CI	P-value
Intercept	0,00224	13,4	0,000 - 0,365	0,019
Age	0,982	1,03	0,923 – 1,045	0,567
Sexe	4,97	1,73	1,69 – 14,6	0,004
IMC	1,27	1,06	1,13 – 1,43	<0,001
Antécédents de diabète familial	3,94	1,63	1,51 – 10,3	0,005
Education	0,355	1,26	0,227 – 0,556	<0,001
Statut Tabagique	7,05	2,04	1,74 – 28,6	0,006
Consommation d'alcool	0,226	1,77	0,074 – 0,694	0,009
Activité Physique	0,445	1,66	0,164 – 1,21	0,112
WQS	8,95	1,79	2,85 – 28,1	<0,001
AIC: 161,8751				

Poids des polluants dans le modèle

Polluant	Poids moyen	Ecart-type des poids
DEP	0,147	0,0987
4,4'-DDE	0,137	0,107
PCB 180	0,115	0,115
PFHxS	0,101	0,102
PCB 118	0,0992	0,105
PFOS total	0,0985	0,103
MEP	0,0596	0,0725
5-OH-MEHP	0,0542	0,0760
PFOA	0,0451	0,0630
MP	0,0323	0,0494
PCB 156	0,0286	0,0622
MnBP	0,0268	0,0476
PCB153	0,0233	0,0516
PCB138	0,0206	0,0735
MBzP	0,00627	0,0199
5-oxo-MEHP	0,00369	0,0166
MiBP	0,00214	0,0108
PFOS linéaire	0,000355	0,00256
PFNA	0,000179	0,00155

Annexe 3 : BKMR pour les composés non persistants

Annexe 3.1 : Réponses individuelles pour le modèle BKMR incluant les polluants urinaires



Annexe 3.2 : PIP pour le modèle BKMR incluant les polluants urinaires

Polluant	Groupe d'inclusion	Groupe PIP	cond PIP
MP	5	0,534	
MEP	6	0,667	
MnBP	7	0,578	
MiBP	8	0,437	
5-oxo-MEHP	9	0,528	0,493
5-OH-MEHP	9	0,528	0,507
MBzP	10	0,475	
DEP	11	0,439	

Annexe 3.3: Interactions entre les polluants pour le modèle BKMR incluant les polluants urinaires

